

Université de Montréal

**Étude de la résistance aux antibiotiques des entérocoques d'origine
animale du Québec**

par

Cindy-Love Tremblay

GREMIP et CRIP

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

philosophiae doctor (Ph.D.)

en sciences vétérinaires

option microbiologie

Août 2012

©Cindy-Love Tremblay, 2012

RÉSUMÉ

Les entérocoques font partie de la flore normale intestinale des animaux et des humains. Plusieurs études ont démontré que les entérocoques d'origine animale pouvaient représenter un réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques pour la communauté humaine et animale. Les espèces *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* sont importantes en santé publique; elles sont responsables d'environ 12% de toutes les infections nosocomiales aux États-Unis. Au Canada, les cas de colonisation et/ou d'infections à entérocoques résistants à la vancomycine ont plus que triplé de 2005 à 2009.

Un total de 387 isolats *E. faecalis* et *E. faecium* aviaires, et 124 isolats *E. faecalis* porcins ont été identifiés et analysés pour leur susceptibilité aux antibiotiques. De hauts pourcentages de résistance envers les macrolides et les tétracyclines ont été observés tant chez les isolats aviaires que porcins. Deux profils phénotypiques prédominants ont été déterminés et analysés par PCR et séquençage pour la présence de gènes de résistance aux antibiotiques. Différentes combinaisons de gènes de résistance ont été identifiées dont *erm*(B) et *tet*(M) étant les plus prévalents. Des extractions plasmidiques et des analyses par hybridation ont permis de déterminer, pour la première fois, la colocalisation des gènes *erm*(B) et *tet*(M) sur un plasmide d'environ 9 kb chez des isolats *E. faecalis* porcins, et des gènes *erm*(B) et *tet*(O) sur un plasmide de faible poids moléculaire d'environ 11 kb chez des isolats *E. faecalis* aviaires. De plus, nous avons démontré, grâce à des essais conjugatifs, que ces plasmides pouvaient être transférés. Les résultats ont révélé que les entérocoques intestinaux aviaires et porcins, lesquels peuvent contaminer la viande à l'abattoir, pouvaient représenter un réservoir de gènes de résistance envers la quinupristine-dalfopristine, la bacitracine, la tétracycline et les macrolides.

Afin d'évaluer l'utilisation d'un antisérum polyclonal SA dans l'interférence de la résistance à de fortes concentrations de bacitracine (gènes *bcrRAB*), lors d'un transfert conjugatif répondant aux phéromones, un isolat multirésistant *E. faecalis* aviaire a été sélectionné. Après induction avec des phéromones produites par la souche réceptrice *E. faecalis* JH2-2, l'agrégation de la souche donatrice *E. faecalis* 543 a été observée ainsi

que des fréquences de transfert élevées en bouillon lors d'une courte période de conjugaison. Le transfert conjugatif des gènes *asa1*, *traB* et *bcrRAB* ainsi que leur colocalisation a été démontré chez le donneur et un transconjugant T543-1 sur un plasmide de 115 kb par électrophorèse à champs pulsé (PFGE) et hybridation. Une CMI de $> 2\,048\ \mu\text{g/ml}$ envers la bacitracine a été obtenue tant chez le donneur que le transconjugant tandis que la souche réceptrice JH2-2 démontrait une CMI de $32\ \mu\text{g/ml}$. Le séquençage des gènes *asa1*, codant pour la substance agrégative, et *traB*, une protéine régulant négativement la réponse aux phéromones, a révélé une association de cet élément génétique avec le plasmide pJM01. De plus, cette étude présente qu'un antisérum polyclonal SA peut interférer significativement dans le transfert horizontal d'un plasmide répondant aux phéromones codant pour de la résistance à de fortes doses de bacitracine d'une souche *E. faecalis* aviaire multirésistante.

Des isolats cliniques *E. faecium* d'origine humaine et canine ont été analysés et comparés. Cette étude rapporte, pour la première fois, la caractérisation d'isolats cliniques *E. faecium* résistants à l'ampicilline (EFRA) d'origine canine associés à CC17 (ST17) au Canada. Ces isolats étaient résistants à la ciprofloxacine et à la lincomycine. Leur résistance envers la ciprofloxacine a été confirmée par la présence de substitutions dans la séquence en acides aminés des gènes de l'ADN gyrase (*gyrA/gyrB*) et de la topoisomérase IV (*parC/parE*). Des résistances élevées envers la gentamicine, la kanamycine et la streptomycine, et de la résistance envers les macrolides et les lincosamides a également été observées. La fréquence de résistance envers la tétracycline était élevée tandis que celle envers la vancomycine n'a pas été détectée. De plus, aucune résistance n'a été observée envers le linézolide et la quinupristine-dalfopristine. Les données ont démontré une absence complète des gènes *esp* (protéine de surface des entérocoques) et *hyl* (hyaluronidase) chez les isolats canins EFRA testés tandis qu'ils possédaient tous le gène *acm* (adhésine de liaison au collagène d'*E. faecium*). Aucune activité liée à la formation de biofilm ou la présence d'éléments CRISPR (loci de courtes répétitions palindromiques à interespaces réguliers) n'a été identifiée chez les isolats canins EFRA. Les familles de plasmide *rep6* and *rep11* ont significativement été associées aux isolats d'origine canine. Les profils PFGE des isolats d'origine humaine et canine n'ont révélé aucune relation ($\leq 80\%$). Ces résultats illustrent

l'importance d'une utilisation judicieuse des antibiotiques en médecine vétérinaire afin d'éviter la dissémination zoonotique des isolats EFRA canins.

Nous pensons que ces résultats contribueront à une meilleure compréhension des mécanismes de résistance aux antibiotiques et de leurs éléments mobiles ainsi qu'à de nouvelles stratégies afin de réduire le transfert horizontal de la résistance aux antibiotiques et des facteurs de virulence.

Mots-clés : *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, résistance aux antibiotiques, plasmide, conjugaison répondant aux phéromones, antisérum polyclonal SA, virulence, commensal, clinique.

ABSTRACT

Enterococci are part of normal intestinal gut flora of animals and humans. Many studies have shown that enterococci from animal origin could represent an antimicrobial resistance genes reservoir for the human community. The two species *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are important in public health; they are responsible for approximately 12% of all nosocomial infections in the United States. In Canada, cases of colonization and/or infections to vancomycin resistant enterococci have more than tripled from 2005 to 2009.

A total of 387 poultry *E. faecalis* and *E. faecium* isolates, and 124 porcine *E. faecalis* isolates were identified and analyzed for their antibiotic susceptibilities. High percentages of resistance to macrolides and tetracyclines were found in both avian and porcine isolates. Two predominant phenotypic profiles were determined and analyzed by PCR and sequencing for the presence of antimicrobial resistance genes. Various combinations of antibiotic resistance genes were detected; *erm*(B) and *tet*(M) were the most common genes. For the first time, plasmid extraction and hybridization revealed colocalization of *erm*(B) and *tet*(M) on a plasmid of ~9 kb in porcine *E. faecalis* isolates, and of *erm*(B) and *tet*(O) on a low-molecular-weight plasmid of ~11 kb in poultry *E. faecalis* isolates. Furthermore, we demonstrated, through mating experiments, these plasmids could be transferred. Results indicate that the intestinal enterococci of healthy pigs and poultry, which can contaminate meat at slaughter, could be a reservoir for quinupristin-dalfopristin, bacitracin, tetracycline, and macrolide resistance genes.

To assess the use of a polyclonal antiserum AS on the contact interference of a high level bacitracin resistant (*bcrRAB* genes) pheromone-responsive plasmid, a multiresistant *E. faecalis* isolate of poultry origin was selected. After induction with pheromones produced by the recipient strain *E. faecalis* JH2-2, clumping of the donor *E. faecalis* strain 543 was demonstrated as well as high transfer frequencies in short time broth mating. Conjugative transfer of *asa1*, *traB* and *bcrRAB* genes and their colocalization were also demonstrated in the donor strain and a transconjugant T543-1 on a plasmid band of 115 kb by PFGE and Southern blotting. A MIC to bacitracin of > 2 048 µg/ml was obtained for both strains 543 and T543-1 whereas the recipient strain JH2-2 demonstrated a MIC of 32 µg/ml. Sequencing of the *asa1* gene encoding for an AS, and

traB for a pheromone shutdown protein, confirmed the association of this genetic element to the pheromone-responsive plasmid related to pJM01. More significantly, this study presents the evidence that a polyclonal antiserum AS can significantly interfere with the horizontal transfer of a pheromone-responsive plasmid encoding high-level bacitracin resistance of a poultry multidrug resistant *E. faecalis* strain.

Clinical isolates of *E. faecium* of human and canine origin were analyzed and compared. This report describes for the first time the characterization of canine clinical ampicillin-resistant *E. faecium* (AREF) isolates related to CC17 (ST17) in Canada. These isolates were resistant to ciprofloxacin and lincomycin. Resistance to ciprofloxacin was confirmed by amino acid substitutions in DNA gyrase (*gyrA/gyrB*) and topoisomerase IV (*parC/parE*) genes. High-level gentamicin, -kanamycin and -streptomycin resistances and macrolides resistance were also observed. The frequency of tetracycline resistance was high whereas vancomycin resistance was not detected. Also, no resistance was observed to linezolid and quinupristin-dalfopristin antibiotics. Data demonstrated the complete absence of enterococcal surface protein (*esp*) and hyaluronidase (*hyl*) genes among the canine AREF isolates tested while all were *acm* (collagen adhesin from *E. faecium*) positive. However, most of them were shown to harbor *efaA_{fm}* gene, encoding for a cell wall adhesin. No biofilm formation or clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) elements were identified in these canine AREF isolates. *rep₆* and *rep₁₁* families of plasmids were significantly associated with isolates from dogs. The PFGE patterns of human and dog isolates were considered unrelated ($\leq 80\%$). These findings also support the importance of prudent use of antibiotics in veterinary medicine to avoid zoonotic spread of canine AREF isolates.

We are confident that our results may help to better understand the mechanisms of antibiotic resistance and mobile element carrying them as well as new strategies to reduce the horizontal transfer of antibiotic resistance and virulence traits.

Key words: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, antimicrobial resistance, plasmid, pheromone-responsive conjugation, polyclonal antiserum AS, virulence, commensal, clinical.

SOMMAIRE

RÉSUMÉ.....	II
ABSTRACT	V
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	XVI
REMERCIEMENTS.....	XX
I. INTRODUCTION	1
II. RECENSION DES ÉCRITS	7
1. <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Enterococcus faecium</i>	8
1.1 Taxonomie et description du genre	8
1.2 Habitat et pouvoir pathogène	11
1.2.1 Entérocoques commensaux	11
1.2.1.1 Humain	12
1.2.1.2 Porc et volaille.....	13
1.2.1.3 Autres	14
1.2.2 Entérocoques associés à des signes cliniques.....	15
1.2.2.1 Humain	15
1.2.2.2 Porc, volaille et autres animaux	16
1.3 Facteurs de virulence.....	17
1.3.1 Facteurs liés à la membrane	18
1.3.1.1 Protéines de liaison au collagène.....	19
1.3.1.2 Protéines de surface extracellulaire	21
1.3.1.3 Acide lipotéichoïque.....	24
1.3.1.4 Substance agrégative	26
1.3.2 Facteurs sécrétés.....	28
1.3.2.1 Cytolysine.....	28
1.3.2.2 Bactériocines	31
1.3.2.3 Hyaluronidases, gélatinase et sérine protéase	35
1.3.2.4 Production de superoxyde extracellulaire	38
1.3.3 Capsule et paroi cellulaire polysaccharidique	39
1.3.4 Biofilm.....	40

1.4 Microorganismes indicateurs de résistance aux antibiotiques	42
1.4.1 Programmes de surveillance de l'antibiorésistance.....	42
1.4.2 Méthodes phénotypiques de détection de la résistance aux antibiotiques.....	44
1.4.3 Méthodes génotypiques de détection de la résistance aux antibiotiques.....	46
2. Antibiotiques et antibiorésistance.....	50
2.1 Définition et antibiotiques utilisés en productions aviaire et porcine	50
2.2 Résistance aux antibiotiques	55
2.2.1 Résistance naturelle et acquise	56
2.2.2 Résistance acquise	57
2.2.2.1 Conjugaison, transformation et transduction.....	57
2.2.2.2 Conjugaison répondant aux phéromones	60
2.2.2.3 Persistance de la résistance acquise.....	67
2.2.3 Éléments génétiques mobiles	69
2.2.3.1 Plasmides.....	69
2.2.3.1.1 Plasmides répondant aux phéromones	72
2.2.3.2 Transposons.....	76
2.2.3.4 Îlots de pathogénie.....	81
2.2.4 Mécanismes de résistance	83
3. Antibiorésistance chez les entérocoques.....	87
3.1 Résistance naturelle.....	87
3.2 Résistance acquise.....	88
3.2.1 Résistance acquise des entérocoques d'origine aviaire et porcine	91
3.2.2 Résistance acquise des entérocoques provenant des animaux de compagnie	97
3.2.3 <i>E. faecalis</i> et <i>E. faecium</i>	99
3.3 Transfert horizontal de la résistance aux antibiotiques par la conjugaison répondant aux phéromones.....	102
3.3.1 Blocage du transfert.....	104

III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS 106

ARTICLE I :

“Multiple-Antibiotic Resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Cecal Contents in Broiler Chicken and Turkey Flocks Slaughtered in Canada and Plasmid Colocalization of *tetO* and *ermB* Genes” 109

ARTICLE II :

“Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecalis* in Abattoir Pigs and Plasmid Colocalization and Cotranfer of *tet(M)* and *erm(B)* Genes” 135

ARTICLE III :

“Interference in Pheromone-Responsive Conjugation of a High-Level Bacitracin Resistant *Enterococcus faecalis* Plasmid of Poultry Origin” 161

ARTICLE IV :

“Characterization of Clinical Isolates of Ampicillin-Resistant *Enterococcus faecium* CC17 (ST17)-Related Lineages from Dogs and Humans” 189

IV. DISCUSSION 218

1. Résistance phénotypique aux antibiotiques..... 219

2. Résistance génotypique aux antibiotiques..... 227

3. Prévalence de la résistance aux antibiotiques : analyse de bactéries indicatrices versus analyse métagénomique 233

4. Évaluation de l’antisérum Agg dans l’interférence du transfert des gènes de résistance aux antibiotiques..... 236

5. Association entre la virulence et la résistance aux antimicrobiens chez des souches cliniques humaines et canines 243

V. CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES..... 249

VI. SOURCES DOCUMENTAIRES..... 256

LISTE DES TABLEAUX

RECENSION DES ÉCRITS

Tableau I : Tests biochimiques pour identifier <i>E. faecalis</i> et <i>E. faecium</i>	10
Tableau II : Pourcentage des espèces <i>Enterococcus</i> retrouvées chez le porc et la volaille	14
Tableau III : Infections chez les animaux causées par les entérocoques	17
Tableau IV : Bactériocines produites par <i>Enterococcus</i> spp.	34
Tableau V : Principaux programmes de surveillance de la résistance aux antimicrobiens	43
Tableau VI : Les antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire et leur mécanisme d'action	52
Tableau VII : Types d'utilisations des antibiotiques en production aviaire et Porcine	53
Tableau VIII : Antibiotiques utilisés au Canada chez la volaille, le porc et les humains	54
Tableau IX : Représentation schématique des étapes de la conjugaison des quatre plasmides répondant aux phéromones les mieux caractérisés avec spécification des déterminants moléculaires clés des fonctions de conjugaison	61
Tableau X : Plasmides répondant aux phéromones détectés chez <i>E. faecalis</i> et <i>E. faecium</i>	75
Tableau XI : Transposons détectés chez les entérocoques	78
Tableau XII : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques	85
Tableau XIII : Résistance intrinsèque aux antimicrobiens chez les entérocoques	88
Tableau XIV : Liste des principales substances antimicrobiennes utilisées comme facteur de croissance chez le porc à l'engraissement au Québec	91
Tableau XV : Résistance observée chez <i>E. faecalis</i> d'origine porcine et avicole	92
Tableau XVI : Résistance observée chez <i>E. faecium</i> d'origine porcine et avicole	93

MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article I : Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from cecal contents in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Canada and plasmid colocalization of *tet(O)* and *erm(B)* genes.

Table 1. Antimicrobial resistance in *E. faecalis* isolates from turkey and chickens based on MIC. 130

Table 2. Antimicrobial resistance in *E. faecium* from turkey and chickens based on MIC. 131

Table 3. Main phenotypic multiresistance profiles observed among *E. faecium* and *E. faecalis* isolates from poultry. 132

Table 4. Genotypic profiles of the predominant multiresistant phenotype (BAC-ERY-LIN-QD-TET-TYL) of *E. faecium* and *E. faecalis* isolates. 133

Article II : Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecalis* in Abattoir Pigs and Plasmid Colocalization and Cotransfer of *tet(M)* and *erm(B)* Genes.

Table 1. Selection criteria of the six representative multiresistant isolates of *E. faecalis* harbouring *tet(M)* and *erm(B)* genes from the two predominant profiles for plasmid extraction and conjugation. 156

Table 2. Antibiotic resistance in *E. faecalis* isolates from pigs based on MICs. 157

Table 3. Phenotypic resistance profiles observed among *E. faecalis* isolates from pigs. 158

Table 4. Genotypic profiles of the two predominant multiresistant phenotypes of *E. faecalis* isolates. 159

Article III. Interference in Pheromone-Responsive Conjugation of a High-Level Bacitracin Resistant *Enterococcus faecalis* Plasmid of Poultry Origin.

Table 1. Transfer frequencies of plasmid encoding high-level bacitracin resistance of the donor *E. faecalis* strain 543 to the recipient strain *E. faecalis*

JH2-2 tested by pheromone-responsive mating experiments with or without addition of antibodies	183
--	-----

Article IV. Characterization of Clinical Isolates of Ampicillin-Resistant *Enterococcus faecium* ST17-Related Lineages from Dogs and Humans.

Table 1.	Antibiotic resistance of <i>E. faecium</i> clinical isolates from humans and dogs based on MICs.	212
Table 2.	Characterization of <i>E. faecium</i> isolates from human and canine enterococcal infections.	213
Table 3.	Mutations in <i>gyrA/B</i> and <i>parC</i> of clinical <i>E. faecium</i> isolates with their corresponding ciprofloxacin MIC.	214
Table S1.	PCR primers and products for <i>rep</i> -like genes.	216

DISCUSSION

Tableau I.	Nombre d'antimicrobiens dans les patrons de résistance par espèce chez la volaille.	223
Tableau IIa.	Nombre d'antimicrobiens dans les patrons de résistance des isolats <i>E. faecalis</i> chez le porc.	224
Tableau IIb.	Nombre d'antimicrobiens dans les patrons de résistance des isolats <i>E. faecalis</i> chez le porc.	225
Tableau III.	Pourcentage des isolats positifs pour <i>agg</i> dans le profil phénotypique prédominant des isolats <i>E. faecalis</i> aviaires.	237

LISTE DES FIGURES

RECENSION DES ÉCRITS

Figure 1 : Dendrogramme ADNr 16S de la position phylogénétique des <i>Enterococcus</i>	9
Figure 2 : Vue d'ensemble des protéines de surface LPXTG et des pilis des entérocoques	19
Figure 3 : Organisation structurelle des SA des entérocoques	26
Figure 4a : Modèle d'auto-induction de la cytolysine par synergie avec la SA et autres adhésines	29
Figure 4b : Modèle de maturation et de régulation de la cytolysine	30
Figure 5 : Mécanisme d'activation du système de régulation <i>fsr</i> et ses effets sur la synthèse de la gélatinase et de la sérine protéase	37
Figure 6 : Mécanismes génétiques et de dissémination de la résistance aux antibiotiques	59
Figure 7 : Modèle de la mobilisation de la résistance aux antibiotiques de la souche donatrice <i>E. faecalis</i> vers la souche réceptrice <i>Streptococcus gordonii</i> Challis en réponse à la phéromone <i>gordonii</i> -cAM373	64
Figure 8 : Représentation schématique du mécanisme de régulation de la réponse à la phéromone de pAD1	65
Figure 9 : Structures des transposons de chacun des trois groupes transférant des gènes de résistance chez les entérocoques	77
Figure 10 : Structure générale de l'intégron de classe 1	80
Figure 11 : Mécanismes de résistance de la bactérie	84
Figure 12 : Les effets de l'administration d'antibiotiques sur le microbiome intestinal et l'émergence des entérocoques multirésistants	90

MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article I :	Multiple-antibiotic resistance of <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Enterococcus faecium</i> from cecal contents in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Canada and plasmid colocalization of <i>tet</i>(O) and <i>erm</i>(B) genes.	
Figure 1.	Profiling and hybridization of undigested DNA of multiresistant <i>E. faecalis</i> strain 543.	134
Article II :	Antibiotic-Resistant <i>Enterococcus faecalis</i> in Abattoir Pigs and Plasmid Colocalization and Cotransfer of <i>tet</i>(M) and <i>erm</i>(B) Genes.	
Figure 1.	Profiling and hybridization of undigested plasmid DNA of the multiresistant <i>E. faecalis</i> strain 748 and one of its transconjugant.	160
Article III.	Interference in Pheromone-Responsive Conjugation of a High-Level Bacitracin Resistant <i>Enterococcus faecalis</i> Plasmid of Poultry Origin.	
Figure 1.	PFGE and hybridization of strains <i>E. faecalis</i> 543 and T543-1.	184
Figure 2.	SDS-PAGE and Western blot of the purified protein AS.	185
Figure 3.	Western blot on <i>E. faecalis</i> protein extracts and purified Agg protein.	186
Figure 4.	Clumping assays with <i>E. faecalis</i> 543 induced and <i>E. faecalis</i> JH2-2.	187
Figure 5.	Interference in the formation of aggregates using anti-AS ₄₄₋₅₆₀ antibodies by microscopy	188
Article IV.	Characterization of Clinical Isolates of Ampicillin-Resistant <i>Enterococcus faecium</i> ST17-Related Lineages from Dogs and Humans.	
Figure 1.	PFGE types and ST groups of <i>E. faecium</i> clinical isolates of canine and human origins.	215
Figure S1.	eBURST-based population snapshot of <i>E. faecium</i> CC17 based on 612 STs representing 1993 isolates contained in the online <i>E. faecium</i> MLST database.	217

DISCUSSION

- Figure 1.** Profil de résistance aux antibiotiques des entérocoques isolés de ceca de poulet et de dinde du Québec. 222
- Figure 2.** Profil de résistance aux antibiotiques des entérocoques isolés de ceca de porc du Québec. 222
- Figure 3.** PFGE et hybridation sur la souche *E. faecalis* 52 et le transconjuguant T52-1. 239

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADH	Arginine dihydrolase
ADN (<i>DNA</i>)	Acide désoxyribonucléique (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
ALT (<i>LTA</i>)	Acide lipotéichoïque (<i>lipoteichoic acid</i>)
ARN (<i>RNA</i>)	Acide ribonucléique (<i>ribonucleic acid</i>)
ARNr	ARN ribosomal
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
Bac	Bactériocine
Bc, BAC	Bacitracine
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
Bla	Bêta-lactamase
BS	<i>Binding substance</i> ou substance de liaison
CAT	Chloramphénicol acétyltransférase
CIP	Ciprofloxacine
Cm, CHL	Chloramphénicol
CMB	Concentration minimale bactéricide
CME	Composantes de la matrice extracellulaire
CMi (<i>MIC</i>)	Concentration minimale inhibitrice (<i>minimal inhibition concentration</i>)
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> ou loci de courtes répétitions palindromiques à interespaces réguliers
CR3	<i>Complement receptor 3</i> ou récepteur du complément de type 3
DAP	Daptomycine
DHFR	Dihydrofolate réductase
DHPS	Dihydroptéroate synthase
dNTP	Mélange des quatre désoxyribonucléotides
EFRA (<i>AREF</i>)	<i>Enterococcus faecium</i> résistant à l'ampicilline (<i>ampicillin-resistant Enterococcus faecium</i>)
Em, ERY	Érythromycine
ERV (<i>VRE</i>)	Entérocoques résistants à la vancomycine (<i>vancomycin resistant enterococci</i>)

ESBL	<i>Extended-spectrum beta-lactamase</i> ou bêta-lactamase à spectre étendu
FLA	Flavomycine
Fus	Acide fusidique (<i>fusidic acid</i>)
GBAP	Peptide C-terminal de FsrB
Gel	Phénotype de la gélatinase
GGP	Groupe de gènes pilines
Gm, GEN	Gentamicine
Hly	Hémolysine
HLKR, HLGR and HLSR	<i>High-level kanamycin (gentamicin or streptomycin) resistance</i> ou résistance élevée envers la kanamycine (gentamicine ou streptomycine)
ICE	<i>Integrative conjugative elements</i> ou éléments d'intégration conjugatifs
ICU	<i>Intensive care unit</i> ou unité de soins intensifs
IL	Interleukine (exemple : IL-1 β , IL-6, IL-8)
Inc	Groupe d'incompatibilité (exemple : Inc18)
Km, KAN	Kanamycine
LIN	Lincomycine
LIZ	Linézolide
LPS	Lipopolysaccharide
LPXTG	Motif d'acides aminés (leucine, proline, X, thréonine, glycine) d'ancrage à la paroi cellulaire
MLS	Macrolides-Lincosamides-Streptogramines
MLS _B	ML-Streptogramines du groupe B
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i> ou typage génomique de multiples loci
MSCRAMM	<i>Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i> ou composantes microbiennes de surface reconnaissant les molécules de la matrice extracellulaire
NIT	Nitrofurantoïne
ORF	<i>Open reading frame</i> ou cadre de lecture ouvert
PABA	Acide para-aminobenzoïque

PAI	<i>Pathogenicity Island</i> ou îlot de pathogénie
PBP	<i>Penicillin-binding protein</i> ou protéine de liaison à la pénicilline
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ou réaction de polymérisation en chaîne
PEN	Pénicilline
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i> ou électrophorèse à champs pulsé
PGE2	Prostaglandine 2
PMN	<i>Polymorphonuclear</i> ou polymorphonucléaire
PYRase	Pyroglutamyl aminopeptidase
QD	Quinupristine/dalfoprismine
Rep-PCR	<i>Repetitive element PCR</i> ou amplification de séquences répétées
Rif	Rifampin
RCR	<i>Rolling-circle replication</i> ou réplication par cercle roulant
SA (SA)	Substance agrégative (<i>aggregation substance</i>)
SAL	Salinomycine
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SSC	Saline sodium citrate
STR	Streptomycine
STT	Système Toxine-Antitoxine
TC	Transposon conjugatif
Tc, TET	Tétracycline
Tm	Tobramycine
Tn	Transposon
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> ou facteur de nécrose tumorale alpha
TSB	<i>Tryptic soy broth</i> ou bouillon de soja tryptique
TYL	Tylosine
UV	Ultra-violet
VAN	Vancomycine
VTH	<i>Veterinary Hospital</i> ou hôpital vétérinaire

À ma famille proche et éloignée, et à mes amis(es)

À mon copain, Maxime

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier particulièrement le Dr Sylvain Quessy pour m'avoir présenté à ma directrice de recherche soit Dre Marie Archambault. C'est Dr Quessy qui m'a permis d'obtenir un stage à la faculté de médecine vétérinaire lors de mon baccalauréat et c'est également pour cette raison que j'y suis retournée afin de poursuivre mes études.

Ainsi, je voudrais remercier généreusement ma directrice de recherche, Dre Marie Archambault. Premièrement, pour m'avoir accepté comme sa première étudiante dans son nouveau laboratoire. Au cours de ces dernières années, elle a été pour moi plus qu'une directrice, soit une amie, une sœur et même parfois une seconde mère. Au cours des moments difficiles, j'ai toujours pu compter sur elle, son optimisme, sa bonne humeur et ses nombreux conseils qui ont su me guider tout au long de mon parcours. Elle m'a permis de ne jamais me laisser abattre par les différentes épreuves auxquelles j'ai dû faire face. Je voudrais également la remercier de m'avoir laissé participer à de nombreux congrès scientifiques et également pour son support financier. Merci d'avoir eu confiance en moi et d'avoir permis de me rendre où je suis.

Je voudrais ensuite remercier spécialement mes codirecteurs, Dre Ann Letellier et Dr Jérôme del Castillo. Ce fut un plaisir de travailler avec vous. Nous avons eu de bonnes discussions concernant mon projet de thèse, ce qui m'a permis également de regarder différents horizons. Un remerciement spécial aussi pour le Dr del Castillo pour son expertise en production porcine et les différentes informations qu'il a pu me donner concernant les antibiotiques utilisés dans ce type de production. Je voudrais également remercier en particulier le Dre Letellier pour mes échantillons porcins et également, pour m'avoir prêté à quelques reprises son laboratoire et du matériel.

Je suis également reconnaissante auprès du Dre Martine Boulianne pour m'avoir fourni les échantillons provenant de la volaille et également pour son expertise en production aviaire et les informations qu'elle a pu me fournir concernant les antibiotiques utilisés dans ce type de production. En tant que membre de mon comité conseil, je la remercie également pour ses conseils et les discussions que nous avons eues.

Je voudrais également remercier Dre Josée Harel pour ses nombreux conseils et idées qui ont apporté différentes avenues à mon projet. Son expertise fut grandement appréciée. Un merci aussi à son agent de recherche, Philippe Garneau, qui m'a permis d'effectuer les expérimentations de biopuce à ADN et pour m'avoir fourni certains contrôles positifs pour des gènes de résistance aux antibiotiques. Leurs questions et avis furent d'un grand soutien.

Je suis également reconnaissante de l'aide apportée par les différents membres du Comité et du Jury : Dr Jérôme del Castillo, Dre Ann Letellier, Dre Josée Harel, Dre Martine Boulianne, Dr François Malouin et Dr Mario Jacques. Merci pour votre temps, vos avis et suggestions précieuses.

Je voudrais remercier spécialement les membres du laboratoire du Dre Archambault, passés et présents, Louis-Alexandre Jalbert, Julie Blouin, Audrey Charlebois, Michaël Beaudry-Ferland, Carl F. Uhland et Geneviève Pelletier-Jacques pour leur support, leur écoute, leur conseil et surtout pour leur amitié. Je tiens également à remercier les différents stagiaires qui ont passé dans le laboratoire au cours des dernières années pour leur aide précieuse.

Merci à tous les membres du GREMIP/CRIP pour leurs connaissances qu'ils ont partagé avec moi, leur soutien et encouragement. Merci également au Dr Guy Beauchamp pour son aide dans l'analyse statistique de mes données.

Cette thèse a été financée par différents organismes tels que le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), l'Agence de la Santé Publique du Canada, le « Poultry Industry Council of Canada (PIC), la Fédération des Producteurs de Porcs du Québec (FPPQ) et le fond de départ de l'Université de Montréal et du GREMIP. Durant mes études, j'ai reçu le support financier de différentes bourses et prix provenant de l'Université de Montréal (Faculté des études supérieures et Faculté de médecine vétérinaire), le CRIP et la bourse Lucie Besner sur les Zoonoses. Tout ce support financier a permis de me concentrer pleinement à mes études supérieures. Je remercie donc tous les membres de comité qui m'ont permis de recevoir ces différents prix.

Un remerciement spécial aussi à Hélène Boucher Rhéaume, Manon Coutellier, Diane Rodier et Micheline St-Germain pour leur aide au niveau administratif, leur soutien et encouragement qu'elles m'ont donné.

Maintenant, il est temps de dire un gros merci à toute ma famille et tous mes amis : ma mère Marjolaine, mon père Denis, mon frère Simon et sa blonde Elie, et mes amis Lucie, Nadine, Rachel, Julie, Eliane, Josée qui m'ont suivi de près durant toutes mes études. Je ne vous dirai jamais assez merci d'avoir été là pour moi durant les grosses épreuves que j'ai vécu et d'avoir cru en moi. Votre amour et votre amitié furent d'une grande aide durant toutes ces années. Je vous dis également merci pour votre patience et votre soutien. Un gros merci à tous mes oncles, mes tantes, cousins et cousines de leur présence et encouragement. Je suis également reconnaissante du soutien que j'ai reçu de

mon ancien copain et sa famille. Je ne pourrais également passer à côté de tous les médecins, neurochirurgiens, infirmiers/infirmières, ergothérapeutes, physiothérapeutes, neuropsychologues des différents hôpitaux et centres de réadaptation qui m'ont permis de redevenir moi-même et de poursuivre mes études. Un grand MERCI, je ne serais pas là sans vous tous.

Finalement, un gros merci à mon chum Maxime pour : son amour passionné, sa patience, son écoute, sa confiance en moi, son encouragement perpétuel. Je suis la plus chanceuse des femmes de l'avoir rencontré et qu'il soit maintenant dans ma vie. Nos projets communs me donnent un nouveau souffle. Merci également à sa famille de m'avoir accueilli à bras ouvert et de m'avoir encouragé dans mes études.

Merci!

I. INTRODUCTION

Les entérocoques sont des agents pathogènes opportunistes faisant partie de la flore commensale du tractus gastro-intestinal de l'homme et des animaux [1]. Ils ont été associés à des signes cliniques tels que la diarrhée, la mammite, des infections associées au catheter et du tractus urinaire et à la cholangiohépatite chez les petits animaux [2-5]. Chez l'homme, les entérocoques sont responsables d'infections similaires telles que des bactériémies opportunistes, des endocardites, des infections du tractus urinaire et de plaies chirurgicales, spécialement chez les patients immunosupprimés [6]. Le séquençage des génomes *E. faecalis* et *E. faecium* a révélé la présence de facteurs de virulence et d'ADN exogène pouvant apporter une explication sur la façon dont ces bactéries ont fait la transition de commensaux à pathogènes nosocomiaux [7-9]. L'incidence des infections nosocomiales à entérocoques a augmenté rapidement au cours des 20 dernières années aux États-Unis et dans l'Union Européenne [10-12]. Au Canada, on constate que l'incidence des entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) a fait un bon spectaculaire passant de 1,32 cas de colonisation et/ou infections à 5 cas par 1000 admissions de 2005 à 2009 [13]. Au Québec, une augmentation de 230 % du nombre de nouveaux cas d'ERV a été observée dans les laboratoires des hôpitaux au cours des 4 dernières années [13]. Étant donné leur capacité de résister à diverses conditions environnementales, ils ont le potentiel de se disséminer facilement à travers la chaîne alimentaire et de contaminer l'eau et l'environnement [14]. Ces bactéries sont habituellement retrouvées en grand nombre dans les aliments d'origine animale, tels que les carcasses de bovins, de porcs et de volaille [15, 16], et leur présence est une indication de contamination fécale qui se produit à certaines étapes lors du processus d'abattage de l'animal [16].

Plusieurs facteurs de virulence ont été associés aux infections à entérocoques tant chez l'homme que les animaux. Ceux-ci incluent, *ace* (protéine de la paroi cellulaire se liant au collagène), *acm* (antigène exposé à la surface), *agg* (substance agrégative), *agrB_{fs}* (protéine AgrB d'*E. faecalis*), *esp* (protéine entérocoque de surface), *hyl* (hyaluronidase), *enlA* (entérolysine A), *cadI* (lipoprotéine précurseur de la phéromone cAD1), *cAM373* (précurseur phéromone cAM373), *cCF10* (précurseur phéromone cCF10), *cob* (précurseur phéromone cOB1), *cpdI* (précurseur phéromone cPD1),

cylABLM (hémolysine), *efaA_{fs}* (antigène spécifique à l'endocardite) et *gelE* (gélatinase) [17, 18]. Les gènes *gelE* et *esp* ont démontré une capacité à promouvoir la formation de biofilm chez *E. faecalis* et *E. faecium* [19, 20]. Cette capacité confère des avantages significatifs par l'augmentation de la résistance envers des conditions environnementales adverses et face à une exposition aux antimicrobiens.

La résistance aux agents antimicrobiens peut être intrinsèque, ou acquise via plusieurs mécanismes, incluant la mutation, l'intégration d'éléments génétiques étrangers, ou le transfert de plasmides et de transposons [8, 21]. La résistance est particulièrement importante chez les entérocoques puisque ce groupe de bactéries est intrinsèquement résistants aux agents antimicrobiens couramment utilisés dans les hôpitaux (céphalosporines et autres bêta-lactamines tels que les pénicillines résistantes à la pénicillinase, clindamycine et aminoglycosides) [22, 23]. De plus, les entérocoques ont la capacité de facilement acquérir et exprimer de nouveaux gènes de résistance et peuvent ainsi tolérer la pression de sélection engendrée par la présence d'antibiotiques [11]. La résistance aux antibiotiques chez les entérocoques n'est pas seulement observée dans le milieu hospitalier, mais également en production animale, où une grande quantité d'antibiotiques y est utilisée pour le traitement et le contrôle des maladies. Ainsi, la flore microbienne des animaux de consommation porte fréquemment de la résistance envers un large éventail d'antibiotiques incluant ceux classés d'importance critique en thérapie humaine par l'Organisation Mondiale de la Santé [16]. Les infections causées par les entérocoques sont peu fréquentes chez les animaux de compagnie [24]. Néanmoins, les antibiotiques utilisés dans le traitement d'infections causées par d'autres bactéries, ne sont pas seulement en partie exacte à ceux utilisés en médecine humaine, mais ils peuvent être également de la même classe d'antibiotiques. Ainsi, cela peut résulter également en la co-sélection de la résistance chez les entérocoques retrouvés chez ces petits animaux [25]. La capacité, des entérocoques isolés d'animaux, de transférer des gènes de résistance aux antibiotiques, étant localisés sur des éléments génétiques mobiles, vers des entérocoques intestinaux humains, a été démontrée [26, 27]. Ceci démontre l'importance des entérocoques comme réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques.

Les systèmes de conjugaison impliquant les plasmides et les transposons sont abondants chez les entérocoques [28]. Malgré leur importance, nous avons peu de connaissance sur le contenu génétique des éléments mobiles spécifiques chez cette bactérie [29]. De plus, les gènes de résistance aux antibiotiques, retrouvés chez les entérocoques d'origine animale au Canada, sont peu connus. Des études ont montré que la résistance acquise aux tétracyclines était souvent présente chez les entérocoques de porcs et de volaille ayant également une résistance envers les macrolides, codée par le gène *erm*(B) [30, 31]. Aussi, un système de conjugaison presque exclusivement associé à l'espèce *E. faecalis*, nommé « conjugaison répondant aux phéromones », est fortement relié à la virulence et à la résistance aux antibiotiques [32, 33]. Ce système implique la production de phéromones par une souche réceptrice potentielle et la reconnaissance ultérieure de ces phéromones par une souche donatrice. Chaque phéromone est spécifique à un plasmide particulier ou à un groupe de plasmides homologues [34]. Deux protéines de surface majeures sont produites après l'induction avec la phéromone appropriée, une adhésine appelée substance agrégative (SA), qui permet le contact entre le donneur et le receveur lors de la conjugaison et une protéine d'exclusion de surface qui réduit la possibilité de transfert plasmidique entre les bactéries donatrices [35]. La SA se lie à un récepteur à la surface de la bactérie réceptrice afin de former des agrégats et d'enclencher le processus de conjugaison [36]. De nouveaux plasmides répondant aux phéromones codant pour des gènes de résistance aux antibiotiques sont fréquemment détectés et caractérisés chez les entérocoques [33]. Par contre, peu d'information est disponible sur l'interférence entre les donneurs et les receveurs lors du transfert de gènes de résistance aux antibiotiques par conjugaison répondant aux phéromones [36, 37].

Ainsi, les hypothèses de ce projet sont : 1) Il existe de multiples résistances aux antibiotiques chez les isolats *E. faecalis* et *E. faecium* aviaires et porcins des abattoirs du Québec; 2) Il existe des éléments génétiques mobiles non-décrits codant pour les résistances aux macrolides et aux tétracyclines des isolats *E. faecalis* et *E. faecium* aviaires et porcins du Québec; 3) Il existe une association positive entre le gène de la substance agrégative (*asaI*) et les gènes de résistance aux antibiotiques des isolats *E. faecalis* aviaires et/ou porcins du Québec; 4) L'utilisation d'un antisérum Agg (ou SA) interfère dans la conjugaison répondant aux phéromones en bloquant ou diminuant le

transfert des gènes de résistance aux antibiotiques des isolats *E. faecalis* de la volaille et/ou du porc du Québec; 5) Il existe des associations significatives, au niveau phénotypique et génotypique, entre la virulence et la résistance aux antibiotiques des isolats cliniques *E. faecium* d'origines humaine et canine.

Le principal objectif de ce projet est d'étudier la résistance aux antibiotiques des entérocoques d'origine animale du Québec. Ce projet comprend les objectifs spécifiques suivants :

1. Caractériser la résistance aux antibiotiques phénotypique et génotypique des *E. faecalis* et *E. faecium* aviaires et porcins des abattoirs du Québec et les éléments génétiques mobiles codant pour de la résistance envers les macrolides et les tétracyclines.
2. Détecter la présence du gène de virulence *asaI*, qui code pour la substance agrégative, chez les isolats multi-résistants, et déterminer la présence d'une association plasmidique ou d'un co-transfert de ce gène et de gènes de résistance aux antibiotiques.
3. Suite à la détection d'une colocalisation plasmidique du gène *asaI* et de gènes de résistance aux antibiotiques, l'interférence par un antisérum polyclonal Agg₄₄₋₅₆₀ est évaluée dans le processus de la conjugaison répondant aux phéromones.
4. Le dernier objectif consiste à caractériser et comparer des souches cliniques d'*E. faecium* d'origines humaine et canine.

Ce travail permet de décrire les profils de résistance phénotypique et génotypique en contribuant en une meilleure compréhension de la résistance des isolats *E. faecalis* et *E. faecium* aviaires et porcins du Québec. L'analyse des éléments génétiques mobiles de ces isolats augmente nos connaissances sur la plasticité génomique des entérocoques et leur grande capacité d'accumuler des gènes de résistance aux antibiotiques. Puisque nous étions face à la présence d'un plasmide répondant aux phéromones non-décrit jusqu'à présent dans un isolat *E. faecalis* aviaire, nous devons démontrer préalablement la capacité d'interférer dans le transfert horizontal de ce plasmide et également,

d'interférer dans la formation d'agrégats y étant rattachée par l'utilisation d'un antisérum polyclonal SA. Ainsi, cette étude permet également d'ouvrir la porte sur de nouvelles stratégies portant sur la diminution du transfert horizontal de la résistance aux antibiotiques via le blocage de molécule impliquée dans la conjugaison répondant aux phéromones. Ce projet permet d'identifier et de caractériser des facteurs associés à la virulence et à la résistance aux antibiotiques d'isolats cliniques humains et canins du Québec, Canada afin de mieux déterminer leur importance dans l'environnement hospitalier.

II. RECENSION DES ÉCRITS

1. *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*

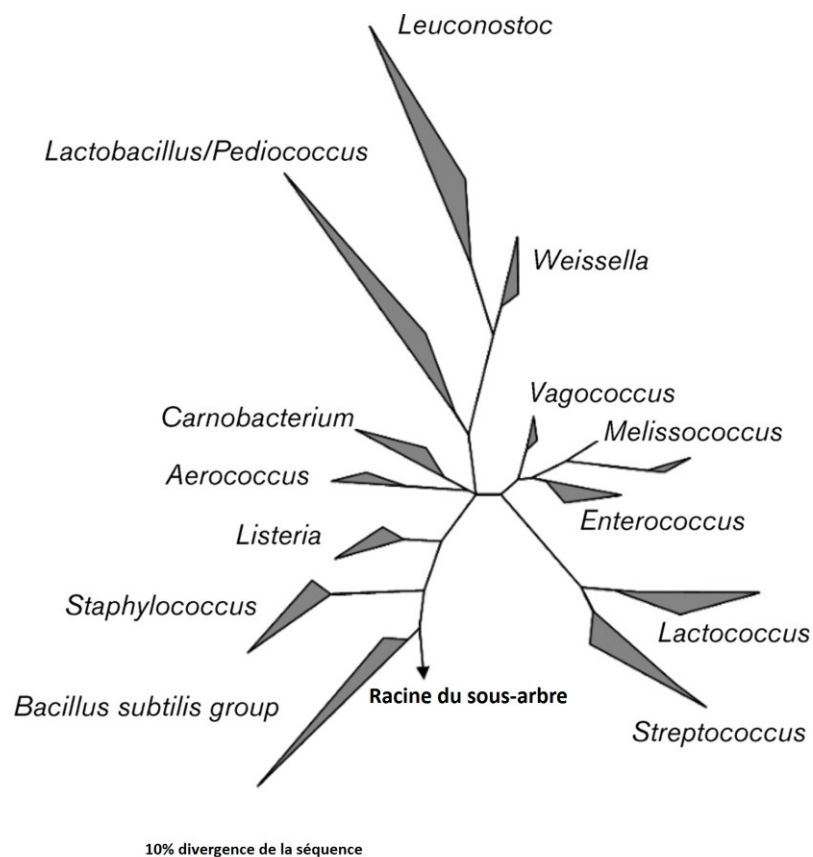
1.1 Taxonomie et description du genre

Le genre *Enterococcus* est un groupe de bactéries à Gram-positif, catalase négative, non-sporulant, anaérobie facultatif et pouvant être en coques isolées, en paires ou en courtes chaînes. Les entérocoques font partie d'un groupe de microorganismes nommés bactéries à acide lactique produisant des bactériocines. Une de leurs caractéristiques consiste en un faible contenu G+C de <50 mol% [38]. Il n'y a pas de caractéristiques phénotypiques qui permettent de distinguer avec certitude les espèces *Enterococcus* des autres coques à Gram-positif, catalase-négative. Ainsi, l'identification se fait habituellement par méthodologie inversée, c'est-à-dire par élimination, en premier lieu, des autres espèces.

Le genre *Enterococcus* est reconnu depuis 1899; Thiercelin utilisa ce terme afin de décrire l'observation de bactéries en paire ou en courtes chaînes dans les fèces humaines [39]. Sa taxonomie et son écologie ont été révisées par Klein en 2003. Plusieurs tentatives ont été effectuées afin de distinguer les espèces *Enterococcus* de celles des *Streptococcus*. En 1937, Sherman a classé les espèces *Streptococcus* en quatre sous-groupes : les streptocoques fécaux (entérocoques), les streptocoques du lait, le groupe viridans (α -hémolytiques) et les streptocoques pyogènes (β -hémolytiques) [40]. Le terme « streptocoques fécaux (entérocoques) » utilisé par Sherman (1937), servait à décrire les streptocoques pouvant croître à 10°C et 45°C, en bouillon avec un pH de 9.6 et contenant 6.5% de NaCl, et pouvant survivre à une température de 60°C pendant 30 minutes. Sherman a également noté que les entérocoques incluaient les streptocoques du groupe D de Lancefield et a suggéré la possibilité de différencier ces derniers par réactions hémolytiques et protéolytiques [39]. Les méthodes traditionnelles telles que le biotypage, le sérotypage et le typage phagique ne permettaient pas de déterminer quelles espèces de *Streptococcus* faisaient parties du genre *Enterococcus* [41]. En 1984, grâce à l'utilisation de techniques d'hybridation à ADN et de séquençage de l'ARNr 16S, il a été établi que les espèces *Streptococcus faecium* et *Streptococcus faecalis* étaient suffisamment distinctes des autres streptocoques afin de désigner un nouveau genre [42]. Plusieurs espèces ont été transférées du groupe streptocoque au groupe entérocoque. Le genre *Enterococcus* inclut actuellement plus d'une trentaine d'espèces dont deux

nouvelles (*E. ureasiticus* sp. nov. et *E. quebecensis* sp. nov.) ayant été isolées et identifiées au Québec en 2010 [43, 44]. La distinction entre les espèces *Enterococcus* des autres coques qui n'expriment pas l'antigène de groupe D, tels que les espèces *Pediococcus*, *Lactococcus* ou *Tetragenococcus*, est plus difficile, puisqu'aucune autre différence phénotypique n'a été décrite (voir Figure 1). Ainsi, d'autres caractéristiques, telles que les profils de fermentation, les activités enzymatiques (ex. : pyroglutamyl aminopeptidase) (PYRase) [45], la croissance à des températures définies et les caractéristiques physiologiques, sont essentielles à l'identification des espèces *Enterococcus* [46].

Figure 1. Dendrogramme ARNr 16S de la position phylogénétique de l'espèce *Enterococcus* (adapté de Klein, 2003 [40]).



En regardant de plus près les espèces *E. faecalis* et *E. faecium*, ces derniers ont des phénotypes caractéristiques (Tableau I) : présence de l'antigène du groupe D de

Lancefield, hydrolyse de l'esculine, tolérance à 40% de bile, production d'acétoïne, fermentation du ribose, croissance à 10°C et à 45°C, croissance en présence de 6.5 % de NaCl, croissance à un pH 9.6 et synthèse d'une pyrrolidonyl-arylamidase. Par contre, d'autres coques à Gram-positif et catalase-négative peuvent posséder un ou plusieurs de ces caractères phénotypiques.

Tableau I. Tests biochimiques pour identifier *E. faecalis* et *E. faecium* (modifié de [47]).

Tests	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
	Pyrrolidonyl-arylamidase +, mannitol +, sorbitol +, sorbose -, ADH +	Pyrrolidonyl-arylamidase +, mannitol +, sorbitol -, sorbose -, ADH +
Mobilité	-	-
Pigmentation	-	-
Tellurite*	+	-
Arabinose	-	+
Lactose	+	+
Raffinose	-	-**
Ribose	+	+
Saccharose	+	d

* : Croissance en présence de 0.04 % de tellurite.

** : Celles isolées principalement chez la volaille acidifient le raffinose.

d : Réponse variable selon les souches

Les différences dans les génomes des espèces *E. faecalis* et *E. faecium* ont été déterminées grâce à l'utilisation de l'hybridation compétitive de l'ADN et par le séquençage du gène de ménage *atpA* [46, 48]. Les séquences spécifiques à *E. faecalis*, comparées à celles d'*E. faecium*, codent principalement pour des protéines de surface. Si on regarde dans l'ensemble, 6.4% du génome *Enterococcus* est associé à des protéines de surface et 22.6% de ces différences entre les deux espèces se retrouvent dans ces gènes. Cette variation semblerait avoir des implications dans l'évitement des différentes réponses du système immunitaire de l'hôte [46].

Pour la différenciation des deux principales espèces d'*Enterococcus*, soient *E. faecalis* et *E. faecium*, les techniques utilisées consistent surtout en une amplification de gènes spécifiques à l'espèce et au séquençage [47]. Les gènes spécifiques à l'espèce

amplifiés sont principalement : *ddl* (D-Ala :D-Ala ligase), *efaA* (protéine A des entérocoques), *ace* (adhésine du collagène spécifique à *E. faecalis*), *tuf* (facteur d'élongation EF-Tu impliqué dans la formation des chaînes peptidiques), et *EMI* (fragment d'ADN génomique hautement spécifique et conservé chez *E. faecium*). L'amplification des gènes *ddl_{fs}* et *EMI* est la technique d'identification des espèces *E. faecalis* et *E. faecium* la plus fréquemment utilisée [47, 49]. L'autre technique consiste à faire le séquençage de gènes démontrant une variabilité assez élevée entre eux permettant ainsi d'identifier les différentes espèces. Des exemples de ces gènes sont : l'ARNr 16S, l'ADNr 16S, le domaine V de l'ARNr 23S, la ligase D-Ala :D-Ala (*ddl*) laquelle est impliquée dans la synthèse du peptidoglycan, la superoxide dismutase manganèse-dépendante (*sodA*), et la chaperonine 60 (*cpn60*) laquelle est impliquée dans la réponse au choc thermique. De plus, il existe également des kits d'identification commerciaux et des systèmes automatisés tels que le système Vitek, l'API 20S, l'API Rapid ID 32 et le MicroScan, en ordre d'efficacité d'identification à l'espèce [47]. Le système MicroScan est hautement efficace à l'identification des espèces *E. faecalis* et *E. faecium*, mais il nécessite des améliorations pour les autres espèces.

1.2 Habitat et pouvoir pathogène

1.2.1 Entérocoques commensaux

Les entérocoques sont de bons indicateurs de contamination fécale. Ces bactéries sont isolées de tous les échantillons de selles d'origine humaine et dans de très nombreuses fèces d'origine animale. La prévalence des différentes espèces d'entérocoques semble varier selon l'hôte et est aussi influencée par l'âge, l'alimentation et d'autres facteurs qui peuvent être reliés aux changements des conditions physiologiques notamment les maladies sous-jacentes et thérapie antérieure aux antimicrobiens [50]. Ils survivent plus longtemps dans l'eau que les coliformes et ils ne s'y multiplient pas [51]. Les entérocoques peuvent contaminer plusieurs aliments tels que les produits laitiers, les viandes, les produits de la pêche, mais également les légumes via le sol et l'eau contaminés.

1.2.1.1 Humain

Le corps humain, même en santé, est colonisé par une communauté microbienne qui, ensemble, constitue la microflore normale. Ces communautés peuvent être détectées dans le tractus respiratoire supérieur, la cavité orale, le tractus intestinal distal, le vagin et la peau. Chaque facteur physicochimique de chacune de ces régions du corps fournit des conditions qui permettent la sélection de microbes parfaitement adaptés. La microflore bactérienne du tractus intestinal a été davantage étudiée due à sa capacité à causer des infections [52].

Les entérocoques sont des membres minoritaires de la communauté bactérienne du tractus gastrointestinal chez l'homme adulte. Les analyses moléculaires ont démontré que ces bactéries ne formaient qu'environ 1% de la microflore intestinale chez un adulte [53]. Parmi toutes les espèces décrites chez les entérocoques, *E. faecalis* et *E. faecium* semblent être les plus détectées dans les fèces humaines [54, 55]. Ces deux espèces vont être retrouvées en plus grand nombre dans le colon, mais les entérocoques peuvent être détectés tout le long du tractus gastro-intestinal ainsi qu'en faible nombre dans la cavité orale [56]. Les entérocoques font également partie de la flore normale du tractus génital, dont *E. faecalis* étant l'espèce prédominante. D'autres espèces, telles *Enterococcus durans*, ont également été détectées en petite proportion chez l'homme adulte en santé. Il en est de même pour l'espèce *Enterococcus avium* qui est retrouvé occasionnellement dans les fèces humaines [55]. On retrouve généralement de 10^5 à 10^7 et 10^4 à 10^5 *E. faecalis* et *E. faecium*, respectivement, par gramme de fèces humaines. Par contre, l'observation de ces deux espèces est beaucoup moins prévalente chez le bétail [57].

La composition de la microflore intestinale est régulée par des facteurs autogéniques et allogéniques [58]. De façon générale, les facteurs autogéniques, qui régulent la communauté bactérienne, consistent en la compétition (deux ou plusieurs microbes en rivalité pour un facteur qui n'est pas présent en quantité suffisante pour satisfaire à la demande) et en l'amensalisme (inhibition des activités d'un ou plusieurs organismes par la production de substances toxiques, le parasitisme, et la prédation). D'un autre côté, les facteurs allogéniques sont des changements provenant de l'extérieur de la communauté et qui ont des effets directs ou indirects sur l'écosystème. Dans le cas de la population des entérocoques, celle-ci va fluctuer en taille, selon l'âge de l'hôte,

dans le tractus intestinal de l'homme [59]. Ces changements se font particulièrement remarquer suite à un traitement aux antibiotiques de par l'augmentation des bactéries anaérobies facultatives. Parmi les bactéries entériques, les entérocoques sont celles étant retrouvés en plus grand nombre chez un individu traité aux antibiotiques [60]. L'observation de ces résultats peut être liée à l'augmentation des anticorps du sérum face aux microorganismes commensaux de l'intestin tels qu'*Escherichia coli* et *E. faecalis* [61].

1.2.1.2 Porc et volaille

La plupart des espèces du genre *Enterococcus* font partie de la flore normale intestinale. Il faut dire que plusieurs espèces peuvent cohabiter dans une même niche écologique. Par contre, il existe quand même une certaine spécificité d'hôte. Les espèces du genre *Enterococcus* les plus retrouvées dans l'intestin des animaux de ferme sont *E. faecalis*, *E. faecium*, *Enterococcus hirae* et *Enterococcus durans*. Chez le porc, ce sont *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *Enterococcus cecorum* et *Enterococcus villorum* qui sont les espèces prédominantes. Tandis que chez la volaille, les espèces les plus fréquemment rencontrées sont *E. durans*, *E. faecium* et *E. faecalis* chez les jeunes oiseaux, et *E. cecorum* chez les oiseaux âgés de plus de 12 semaines [62].

Chez la volaille, la succession de la colonisation par les différents entérocoques est dépendante de l'âge. Avec l'âge, *E. faecalis* est rapidement remplacé par les espèces du groupe *E. faecium* (principalement *E. faecium*, *E. hirae* et *E. durans*), puis finalement par *E. cecorum* [62]. En plus de l'âge, la distribution des espèces semble varier selon les différents compartiments intestinaux. D'autres espèces sont occasionnellement retrouvées chez la volaille telles qu'*Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum* et *Enterococcus mundtii* [62, 63].

Chez le porc, des études ont dénombré la présence des entérocoques selon l'emplacement tel que les amygdales, les intestins et les fèces [63, 64]. Leur présence fut démontrée majoritairement au niveau des intestins. L'espèce la plus fréquemment isolée était *E. faecalis*, tandis qu'*E. faecium*, en proportion plus faible, était plus souvent retrouvé directement dans les fèces. D'autres espèces ont également été retrouvées, telles

qu'*E. hirae*, *E. cecorum*, et plus rarement, les espèces du groupes *E. avium* [63, 64] (Tableau II).

Tableau II. Pourcentage des espèces *Enterococcus* retrouvées chez le porc et la volaille (adapté de [65]).

Espèces <i>Enterococcus</i>	Porc			Volaille		
	Amygdales	Intestins	Fèces	1 jour	3-4 semaines	> 12 semaines
<i>E. avium</i>	-	2	0	0	0	1
<i>E. casseliflavus</i>	-	-	-	0	1	0
<i>E. cecorum</i>	-	12	28	0	9	68
<i>E. durans</i>	-	0	-	2	10	0
<i>E. faecalis</i>	73	42-46	6	47	4	14
<i>E. faecium</i>	27	20-23	50	47	60	14
<i>E. gallinarum</i>	-	0	-	0	1	0
<i>E. hirae</i>	-	22-23	11	0	13	1
<i>E. malodoratus</i>	-	2	6	-	-	-
<i>E. mundtii</i>	-	0-2	-	3	1	1
<i>E. pseudoavium</i>	-	-	-	-	-	-
<i>E. raffinosus</i>	-	-	-	-	-	-
Autres	-	4	-	-	-	-

1.2.1.3 Autres

En plus de se retrouver dans l'intestin de l'homme et des animaux, les entérocoques sont également retrouvés dans les eaux usées, l'eau douce, l'eau de mer, dans le sol et sur les végétaux. Cette grande dispersion provient des différentes voies de transmission, soient féco-orale et aérosol [50].

Les entérocoques peuvent être également retrouvés chez les chats, les chiens, les chevaux, les ânes, les pigeons, les canards et même les insectes [66-69]. Dans l'environnement, on peut les retrouver associés aux plantes (*E. casseliflavus*, *E. mundtii* et *Enterococcus sulfureus*) [70, 71]. Leur présence dans les eaux est plutôt reliée à une contamination fécale environnementale. Dans ce cas, il est important de bien distinguer ceux provenant des plantes versus ceux des animaux [72].

1.2.2 Entérocoques associés à des signes cliniques

1.2.2.1 Humain

Les entérocoques sont des pathogènes opportunistes principalement responsables d'infections nosocomiales chez les individus hospitalisés et immunosupprimés [73]. Ils ont émergé durant les dernières décennies en tant que deuxième à troisième cause la plus commune des infections nosocomiales, incluant les infections du tractus urinaire et des tissus mous, de bactériémies et d'endocardites [74-76]. Les nombreuses résistances intrinsèques et la capacité d'échanger des informations génétiques permettent aux entérocoques de survivre aux conditions adverses de l'environnement et à la pression sélective des antibiotiques. Les infections à entérocoques sont principalement causées par *E. faecalis* et *E. faecium* [77]. Historiquement, *E. faecalis* est responsable de 90% des infections à entérocoques, mais depuis la fin des années 80, une augmentation rapide des infections nosocomiales causées par *E. faecium* est apparue [78, 79]. Cette expansion dans l'environnement hospitalier coïncide avec l'acquisition rapide de multiples mécanismes de résistance envers plusieurs antibiotiques. Les résistances à l'ampicilline et à la vancomycine sont probablement les résistances les plus significatives acquises par *E. faecium* depuis les années 80. Maintenant, il est rapporté que la majorité des isolats cliniques d'*E. faecium* d'origine humaine en Europe et aux États-Unis sont résistants à ces antibiotiques. Par contre, ces traits sont encore relativement rares chez *E. faecalis* [80-82]. Des études sur les populations d'*E. faecium*, utilisant le typage génomique de multiples loci (MLST), ont suggéré que la très grande majorité de ces souches, isolées d'infections nosocomiales, appartenaient distinctement à la lignée génétique nommée Complexe Clonal 17 (CC17) [83, 84].

Les entérocoques sont associés à une variété d'infections cliniques. Pour certaines de ces infections, d'autres microorganismes sont fréquemment isolés du même site. Dans ce genre de situation, il est plus difficile de déterminer si la maladie est le résultat d'une croissance et d'une invasion des tissus par les entérocoques ou si ces derniers, relativement avirulents, jouent un rôle mineur dans l'infection [85]. Les principales infections associées aux entérocoques sont celles du tractus urinaire, intra abdominale, pelvienne, des tissus mous, la bactériémie et l'endocardite. D'autres

infections moins communes sont la méningite, l'ostéomyélite hématogène, l'arthrite septique, les infections néonatales et la pneumonie [17, 86].

La source d'infection pour la plupart des patients est endogène (via leurs propres entérocoques) [17]. Par contre, plusieurs études ont montré que les souches d'*E. faecium* causant des infections chez les patients hospitalisés sont différentes de celles colonisant le tractus gastro-intestinal de l'hôte sain [87, 88]. L'évolution dans les méthodes de typage au cours des dernières années a permis de démontrer que la dissémination importante des entérocoques résistants à de fortes concentrations d'aminoglycosides et résistants à la vancomycine, s'est fait via une transmission entre les patients des soins intensifs des hôpitaux [89, 90]. Le présumé mode de transmission d'un patient à un autre serait les mains des travailleurs de la santé due à la capacité de la bactérie à survivre et à persister durant une période allant jusqu'à 60 minutes [91, 92]. D'autres études démontrent que dans les pays Européens, contrairement à l'Amérique du Nord, les isolats commensaux, via le transfert de gènes de résistance, seraient à l'origine des entérocoques résistants à la vancomycine chez l'homme [93].

1.2.2.2 Porc, volaille et autres animaux

Outre la grande distribution des entérocoques en tant que microflore naturelle de la plupart des mammifères et des oiseaux, ils ont également la capacité de causer des infections chez ceux-ci. L'importance des entérocoques en tant que cause d'infections chez l'animal n'a cependant pas atteint le niveau de préoccupation retrouvé en médecine humaine. Dans plusieurs laboratoires de diagnostic vétérinaire, les infections à entérocoques ne sont pas toujours rapportées [94].

Les entérocoques peuvent être responsables de mammites, de pneumonies, de vaginites, d'arthrites, d'endocardites, de septicémies, de conjonctivites et de blépharites chez différentes espèces animales [17]. Les entérocoques les plus associés aux infections chez la volaille incluent *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. cecorum*, *E. avium* et *E. hirae* [30]. *E. faecalis* cause de l'amylose chez la volaille, plus particulièrement chez les poules pondeuses. *E. hirae* entraîne des retards de croissance importants, et peut causer des troubles nerveux chez les jeunes poussins. La maladie se traduit généralement par des torticolis [65]. Chez le porc, *E. villorum*, *E. durans*, *E. porcinus* et *E. ratti* sont

principalement responsables de diarrhée [95-97]. On peut observer dans le tableau III que les infections chez les animaux sont causées, contrairement chez l'homme, par diverses espèces d'*Enterococcus*.

Tableau III. Infections chez les animaux causés par les entérocoques (adapté de [65]).

Espèce animale	Maladies	Espèces entérocoques
Bovin	Mammite	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. avium</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. pseudoavium</i>
	Diarrhée	<i>E. durans</i>
Rat	Diarrhée	<i>E. rattus</i> (<i>E. hirae</i>)
Porc	Diarrhée	<i>E. villorum</i>
	Cystite	<i>Enterococcus</i> spp.
Volaille	Endocardite, septicémie, encéphalomalacie, trachéite	<i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i>
Poisson, crevette	Infections générales	<i>Enterococcus</i> -like (<i>L. garvieae</i>)
Insecte	Infections générales	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i>
Poulain	Diarrhée	<i>E. durans</i>
Chat	Diarrhée	<i>E. durans</i>
Chien	Diarrhée	<i>E. durans</i>
	Abcès hépatique, discospondylite, péritonite	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
Lama	Septicémie	<i>Enterococcus</i> spp.
Phoque	Abcès, septicémie	<i>Enterococcus</i> spp.

1.3 Facteurs de virulence

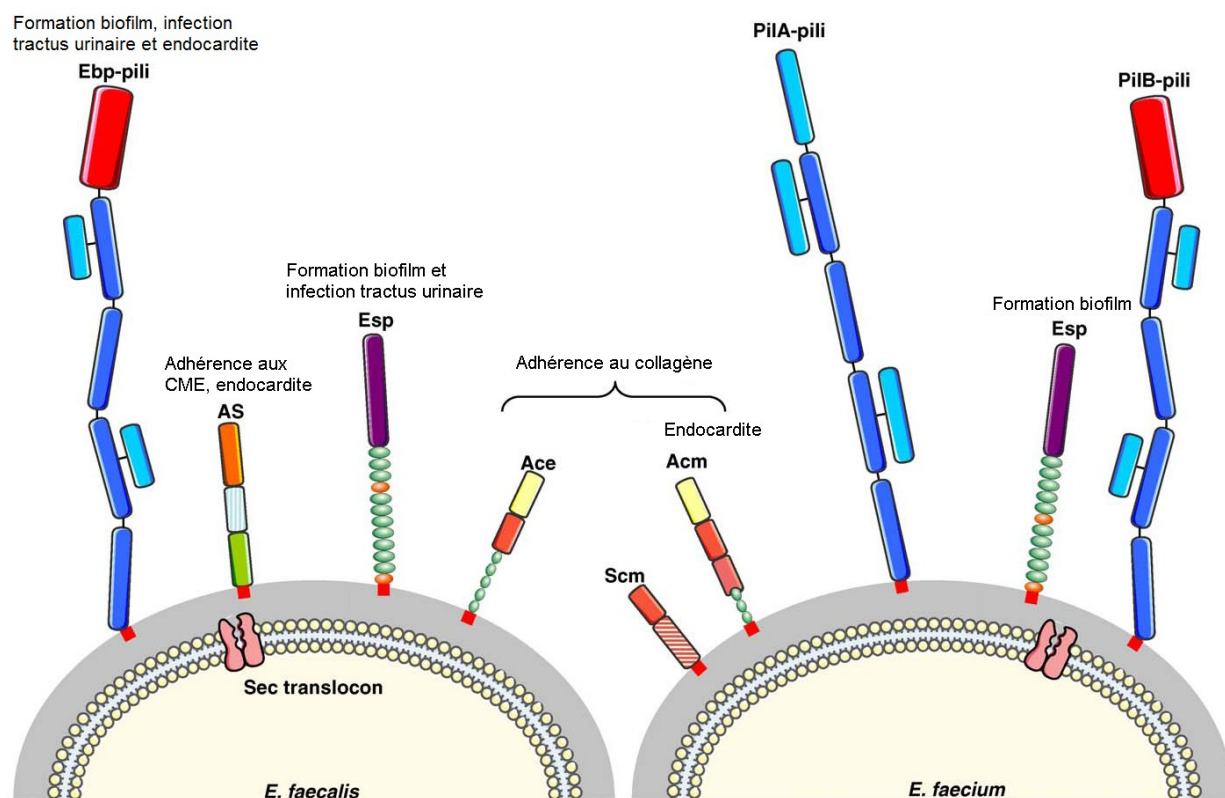
Les facteurs de virulence des entérocoques sont sujets à davantage d'études étant donné leur présence de plus en plus inquiétante lors d'infections nosocomiales et à leur résistance accrue aux antibiotiques. L'espèce dominante des isolats cliniques est *E. faecalis* [98]. La principale raison serait la présence majoritaire des facteurs de virulence chez cette espèce versus *E. faecium*. *E. faecalis* se serait grandement adapté à son environnement qui se trouve à être relié, le plus souvent, à des infections. Tel que mentionné par Busani et al. [99] et Ben Omar et al. [100], les espèces d'*Enterococcus* avec le plus haut niveau de virulence sont celles isolées de cas cliniques suivi par celles d'origine alimentaire et finalement, celles employées comme probiotiques. Plusieurs

facteurs permettent de déterminer la virulence d'une espèce, par exemple l'habileté à : (i) coloniser le tractus gastrointestinal; (ii) d'adhérer à une variété de protéines de la matrice extracellulaire, incluant la thrombospondine, la lactoferrine (espace interstitiel) et la vitronectine; et (iii) d'adhérer à l'épithélium du tractus urinaire, l'épithélium de la cavité orale et les cellules embryonnaires rénales. La plupart des infections semblent être endogènes, par la translocation de la bactérie à travers les cellules épithéliales de l'intestin, laquelle cause ensuite l'infection via les nœuds lymphatiques pour finalement se disséminer à travers les autres cellules du corps [57]. Plusieurs facteurs de virulence vont jouer un rôle crucial lors de ces différentes étapes. Ces facteurs sont représentés par ceux liés à la membrane et ceux sécrétés par la bactérie.

1.3.1 Facteurs liés à la membrane

La figure ci-dessous représente un schéma des différentes adhésines de surface et du pili d'*E. faecalis* (gauche) et d'*E. faecium* (droite) lié de façon covalente via un motif LPXTG (carré rouge) dans le peptidoglycan de la paroi cellulaire (gris). Le translocon Sec y est indiqué. Les protéines de surface LPXTG des entérocoques servent, entre autres, à l'attachement aux ligands de la matrice extracellulaire et aux cellules eucaryotes, et jouent un rôle lors d'une infection. Les fonctions connues, pour le moment, sont représentées au-dessus de la protéine de surface ou de la structure.

Figure 2. Vue d'ensemble des protéines de surface LPXTG et des pili des entérocoques [101].



Légende : Ebp-pili, pilus associé aux endocardites et à la formation de biofilm chez *E. faecalis*; CME, composantes de la matrice extracellulaire; AS, substance agrégative; Esp, protéine de surface des entérocoques; Ace, adhésine de liaison au collagène d'*E. faecalis*; Scm, Seconde adhésine de liaison au collagène d'*E. faecium*; Acm, adhésine de liaison au collagène d'*E. faecium*; PilA-pili, pilus PilA d'*E. faecium*; PilB-pili, pilus PilB d'*E. faecium*.

1.3.1.1 Protéines de liaison au collagène

Les séquences publiées des génomes *E. faecalis* V583 et *E. faecium* TX0016 ont révélé la présence de 17 et 15 MSCRAMMs (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules) [102, 103], respectivement, ceci suppose que les entérocoques ont évolués par l'acquisition de plusieurs stratégies afin d'interagir avec les structures de l'hôte.

Trois principaux MSCRAMMs ont été caractérisés en détail chez les entérocoques et permettraient la liaison de haute affinité à différents types de collagène et autres composantes de la matrice extracellulaire. L'adhésine Ace (adhésine du collagène d'*E. faecalis*) est la première MSCRAMM ayant été décrite chez les entérocoques, et permet la liaison au collagène de type I et IV, à la laminine et à la dentine [104-106]. Acm (adhésine du collagène d'*E. faecium*) interagit avec le collagène de type I, et à un moindre degré, au collagène de type IV [107, 108]. Scm (seconde adhésine du collagène d'*E. faecium*) peut se lier au collagène de type V et au fibrinogène [102]. Ces trois MSCRAMMs de liaison au collagène ont été retrouvés pratiquement chez tous les isolats d'entérocoques d'origines clinique et non clinique. Par contre, malgré la présence prédominante du gène *acm* fonctionnel dans les isolats cliniques, un pseudogène, interrompu par un élément d'insertion, a été souvent détecté dans les isolats d'origine non clinique [109]. Ces isolats, possédant un pseudogène, ne pouvaient pas lier le collagène de type I.

Ces trois MSCRAMMs de liaison au collagène partagent plusieurs caractéristiques. Ces dernières incluent une séquence peptide signal en position N-terminale suivi d'un domaine A de liaison de haute affinité au ligand, consistant en un ou plusieurs variants de repliement de type (IgG) immunoglobuline, un domaine répété B, et un signal d'ancrage à la paroi cellulaire de type LPXTG en C-terminale. L'activité de liaison au collagène de ces trois protéines se trouve dans le domaine A. Les adhésines Ace et Acm partagent des séquences similaires avec la grande famille des MSCRAMMs de liaison au collagène des pathogènes à Gram-positif, dont Cna de *Staphylococcus aureus* [110].

Le rôle de l'adhésine Ace lors d'une infection n'est pas encore clairement déterminé, puisque les mutants par délétion, construits jusqu'à maintenant, n'ont pas été testés *in vivo* [111]. Contrairement à Ace et Scm, la fonction *in vivo* d'Acm a été complètement analysée par des études animales utilisant justement des mutants par délétion du gène. Grâce à ces mutants, le rôle de l'adhésine Acm dans la pathogenèse des endocardites à *E. faecium* a pu être démontré [109]. Dans cette étude, une plus forte colonisation des valves cardiaques par les souches sauvages (74%) versus les souches mutantes (26%) a été observée. De plus, Acm engendrerait une réponse immunitaire

chez l'hôte, puisque des anticorps IgG anti-Acm du domaine A ont été détectés dans le sérum de patients atteints d'endocardites causées par *E. faecium* [109]. Ainsi, Acm permettrait l'adhérence d'*E. faecium* aux valves cardiaques endommagées et riches en collagène. Cette étape serait donc un facteur important dans l'évolution d'une endocardite. Il y aurait également des éléments qui pourraient indiquer que l'adhésine Ace aurait un rôle dans les endocardites, mais ces observations sont indirectes et aucune étude animale n'a été publiée jusqu'à maintenant [112].

Deux nouvelles MSCRAMMs ont été récemment décrites chez l'espèce *E. faecium*. Ces dernières ont été isolées de souches *E. faecium* nosocomiales responsables d'épidémies et d'infections invasives. Ces deux protéines de surface LPXTG ont été nommées SgrA et EcbA [113]. SgrA permettrait la liaison aux molécules de la matrice extracellulaire nidogène 1 et nidogène 2 lesquelles sont des composantes de la lamina basale. EcbA est une nouvelle MSCRAMM d'*E. faecium* qui se lie au collagène de type V. De plus, les deux protéines se lient au fibrinogène; SgrA cible les chaînes alpha et bêta tandis que EcbA se lie à la chaîne gamma. SgrA ne semble pas permettre la liaison de souches *E. faecium* au matériel biologique tel que les cellules intestinales humaines, les cellules de vessie humaine et les cellules rénales. Par contre, cette adhésine serait impliquée dans la formation de biofilm [113]. Ainsi, l'expression de ces deux adhésines semblerait contribuer à la pathogénèse des souches *E. faecium* responsables d'infections nosocomiales.

1.3.1.2 Protéines de surface extracellulaire

La protéine de surface extracellulaire Esp est associée à la paroi cellulaire. Elle a un poids approximatif de 200 kDa et a été décrite pour la première fois chez les espèces *Enterococcus* par Shankar et al. [114]. Le gène *esp* a un poids moléculaire de 5622 pb et est fréquemment retrouvé chez les isolats cliniques. Cette protéine semble promouvoir l'adhérence, la colonisation et l'évasion du système immunitaire, et jouerait un certain rôle dans la résistance aux antibiotiques [42]. Des corrélations significatives ont été observées entre la présence du gène *esp* et la résistance aux antibiotiques chez des souches cliniques *E. faecium* et *E. faecalis* [115-117]. Ces résistances étaient envers

l'ampicilline, la ciprofloxacine et l'imipénème chez *E. faecium*, et envers la doxycycline chez *E. faecalis*. Esp contribue également à la formation de biofilms chez les entérocoques, lesquels peuvent mener à la résistance aux stress environnementaux et aux antibiotiques, et à une adhérence aux cellules eucaryotes (i.e. tractus urinaire) [118]. Deux espèces, *E. faecalis* et *E. faecium*, lorsque de provenance clinique, possèdent fréquemment un îlot de pathogénie contenant le gène *esp*. Cette observation laisse suggérer que la protéine Esp aurait un rôle dans les infections nosocomiales [114, 119]. L'identité en acides aminés entre les protéines Esp d'*E. faecium* (Esp_{fm}) et *E. faecalis* (Esp_{fs}) est élevée (> 90 %) [119], suggérant ainsi que les deux protéines ont la même fonction chez les deux espèces. Elles contiennent toutes deux une séquence signal et un domaine variable en position N-terminale, dont ce dernier étant approximativement formé de 700 acides aminés, suivi de trois domaines répétés désignés A, B et C. Le nombre de répétitions A, B et C dans la protéine Esp, varie d'un isolat à l'autre [114, 119]. L'extrémité C-terminale de la protéine est formée par un motif [Y/F]PXTG, lequel pourrait être reconnu par une sortase, permettant ainsi l'ancrage d'Esp à la paroi cellulaire. Les protéines Esp démontrent une organisation des domaines similaire à celle des protéines de surface α C, Rib, R28 et Bap des streptocoques pathogènes et de *Staphylococcus aureus* [120-123]. La fonction de ce groupe de protéines est peu définie, mais des observations semblent démontrer un rôle de la protéine dans la modulation de la réponse immunitaire envers les bactéries [124]. Il reste à savoir si Esp protège également contre le système immunitaire de l'hôte.

La caractérisation fonctionnelle d'Esp a révélé son rôle dans la formation de biofilm. Une inactivation du gène *esp* par insertion, tant chez *E. faecalis* qu'*E. faecium*, a démontré qu'Esp était impliquée dans l'adhérence initiale et la formation de biofilm après 24h sur des surfaces abiotiques [20, 125]. Des souches *E. faecalis* négatives pour Esp étaient capables de produire un biofilm après avoir reçues un transfert plasmidique du gène [126]. Les fonctions exactes des différents domaines de la protéine Esp restent encore à déterminer. Cependant, quelques évidences semblent démontrer que le domaine N-terminal aurait un rôle important dans la formation des biofilms. Une souche mutante *E. faecalis* exprimant Esp_{fs} sans son domaine N-terminal est significativement diminuée dans la formation de biofilm comparativement à la souche sauvage [127]. De plus, un

mutant n'exprimant que le domaine N-terminal à sa surface produit un biofilm similaire à la souche sauvage [127]. L'ajout de la portion N-terminal d'Esp_{fm} à des bactéries ayant une expression élevée de la protéine Esp, bloque l'attachement initial des cellules au polystyrène [87]. Ainsi, ces observations suggèrent que la capacité de formation de biofilm d'Esp est conférée par son domaine N-terminal et que celui-ci est également impliqué dans les infections à entérocoques associées aux biofilms. De plus, le transfert conjugatif semblerait également être impliqué puisque des souches *E. faecium* qui possèdent le gène *esp_{fm}* ont un taux de conjugaison plus élevé que les souches ne l'ayant pas [128].

Les pili, exposés à la surface des bactéries à Gram-positif, sont des fibres multimériques de protéines de surface LPXTG. Ils sont polymérisés par une sortase de classe C pour être ensuite immobilisés de façon covalente au peptidoglycan de la paroi cellulaire par une sortase de classe A. L'adhérence aux tissus de l'hôte par les protéines de surface et les pili suivie par la colonisation des muqueuses, sembleraient être les étapes initiales et nécessaires dans l'établissement d'une infection, et seraient un pré-requis à la pathogenèse [129].

C'est au début des années 80 que des structures de type pilus ont été détectées par microscopie à transmission électronique à la surface de la bactérie *E. faecalis* JH-2 [130]. À ce moment, les gènes impliqués dans l'assemblage du pilus chez les bactéries à Gram-positif étaient encore inconnus. Des travaux récents effectués chez *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Bacillus* et *Streptococcus* ont révélé que les enzymes sortase, liés aux protéines de surface LPXTG, faisant parties du groupe de gènes pilines (GGP), sont exclusivement impliqués dans l'assemblage du pilus [129]. Les GGPs des entérocoques ressemblent à d'autres loci de pilus de bactéries à Gram-positif. *E. faecalis* possède deux GGPs, l'opéron pili associé aux endocardites et aux biofilms (*ebp*) et le locus initiateur de biofilm chez les entérocoques (*bee*) [131, 132]. Le locus *bee* est localisé sur un plasmide conjugatif et n'a été détecté que sporadiquement (5 %) chez les isolats *E. faecalis*, tandis que le locus *ebp* est trouvé de façon ubiquitaire [133]. Contrairement à *E. faecalis*, *E. faecium* possède quatre GGPs, lesquels ont été nommés GGP-1 à 4 et sont présents de façon prédominante chez les isolats de patients

hospitalisés [134]. La présence de quatre types distincts de GGP s doit donner un avantage sélectif aux isolats *E. faecium*. Jusqu'à maintenant, des résultats expérimentaux ont été obtenus seulement pour les protéines EbpA, EbpB et EbpC (*E. faecalis*), et PilA et PilB (gènes *fms*; *E. faecium*), lesquels ont montré que ces protéines pouvaient s'assembler en un appendice de haut poids moléculaire à la surface de la bactérie [131, 134, 135]. Dans le cas de l'espèce *E. faecalis*, l'assemblage du pilus Ebp est dépendant de la sortase SrtC, tandis que son expression est dépendante du régulateur transcriptionnelle, EbpR [136]. Il semblerait que les sous-unités majeures des pili, chez *E. faecalis* et *E. faecium*, sont les protéines EbpC, PilA et PilB tel qu'observé par microscopie à transmission immunoélectronique. Par contre, ce ne seraient pas tous les entérocoques observés qui exprimeraient le pilus. Les différences dans l'expression du pilus à la surface des bactéries laissent suggérer qu'un mécanisme épigénétique serait impliqué, tels que pour les pili associés à la pyélonéphrite chez *Escherichia coli* [137].

Des expérimentations animales, par l'utilisation de mutants, ont montré un rôle du pilus Ebp de souches *E. faecalis* durant les infections du tractus urinaire et les endocardites, lesquelles sont toutes deux des infections associées à la formation de biofilm [138, 139]. Le rôle des pili *E. faecium* de type PilA et PilB dans la pathogenèse des infections doit être encore étudié. Cependant, l'expression de ces pili à 37°C et non à 21°C [134], et la forte similarité avec les gènes du locus *ebp* d'*E. faecalis*, suggèrent la possibilité d'un rôle dans l'interaction à un hôte mammifère. De plus, une étude récente [135] a observé que les gènes associés à PilA et PilB (*fms*) semblaient être des marqueurs précoces du génogroupe CC17 aux États-Unis contrairement au gène *esp* qui aurait été acquis à différents moments lors de l'évolution de ce génogroupe. Ainsi, ces pili auraient potentiellement un rôle important chez les clones adaptés à l'environnement hospitalier.

1.3.1.3 Acide lipotéichoïque

Contrairement à ce que l'on croit, 50% des septicémies et des chocs septiques sont causés par les bactéries à Gram-positif [140, 141]. Un des produits de ces microorganismes est l'acide lipotéichoïque (ALT), une adhésine amphiphile associée à la membrane. Cette adhésine est un facteur de virulence potentiel et partage plusieurs

propriétés pathophysiologiques du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram-négatif. L'ALT stimule également la production de plusieurs agonistes pro-inflammatoires par les leucocytes, et semble être impliqué dans la pathophysiologie de l'inflammation et de séquelles post-infections tels que le choc septique, les syndrômes de détresse respiratoire et du choc toxique [141, 142].

L'ALT est un polymère composé d'une chaîne de polyglycérolphosphate hydrophile liée par un pont ester à une queue de glycolipide hydrophobe. Chez les entérocoques, ces molécules de surface semblent être identiques à l'antigène de groupe D [143]. La queue hydrophobe permettrait la liaison à une variété de cellules eucaryotes, incluant les plaquettes, les érythrocytes, les lymphocytes, les leucocytes polymorphonucléaires (PMN) et les cellules épithéliales [144]. L'ALT peut être relâché de la surface bactérienne et ce relâchement peut être augmenté par la présence d'antibiotiques agissant sur la paroi cellulaire [145]. Les ALTs, isolés de souches d'*E. faecalis* ou d'autres bactéries à Gram-positif, ont démontré une stimulation des leucocytes à relâcher plusieurs médiateurs, lesquels sont connus comme jouant un rôle dans différentes phases de la réponse inflammatoire. Ces médiateurs incluent le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), l'interleukine 1 β (IL-1 β), l'interleukine 6 (IL-6) [146], et l'interleukine 8 (IL-8) [147] lesquels sont relâchés par des cultures de monocytes et de leucocytes totaux humains. Ils causeraient également le relâchement de la prostaglandine E2 (PGE2), par les macrophages péritonéaux de souris [148], de lysozymes, par les macrophages péritonéaux de rats ([149]), et la génération d'anions superoxide, par les monocytes humains [150].

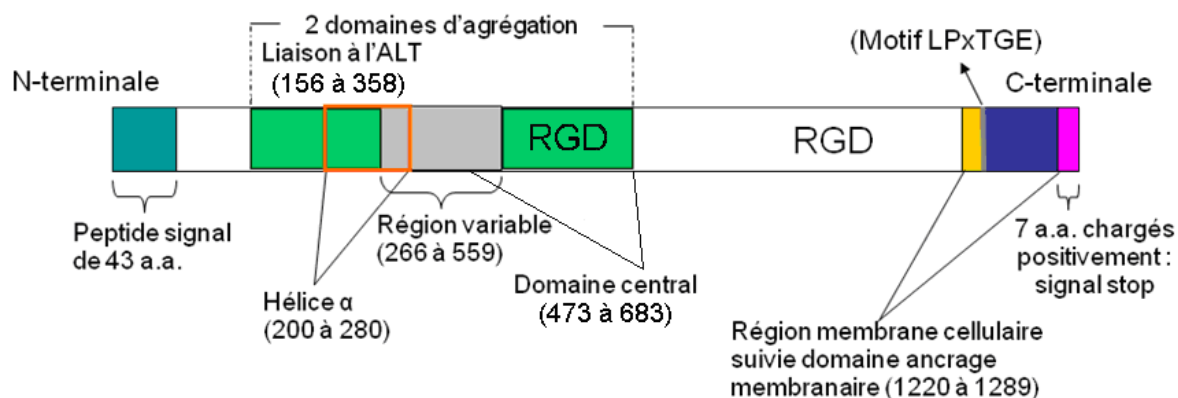
Les antibiotiques agissant sur la paroi cellulaire doivent avoir une activité autolytique appropriée pour tuer efficacement les bactéries à Gram-positif. Cependant, l'ALT a démontré une inhibition de l'autolyse, autant de membranes isolées que de cellules intactes, chez *E. faecalis* (*Enterococcus hirae* ATCC 9790) [151]. De plus, Ehrenfeld et al. [152] ont rapporté que l'ALT, purifié d'*E. faecalis*, inhibait l'induction, phéromone-dépendante, de l'agrégation des cellules bactériennes. L'ALT est une partie importante du complexe de liaison de la substance agrégative des entérocoques [153, 154]. Ce rôle laisse entrevoir l'importance de l'ALT dans la dissémination horizontale d'éléments génétiques mobiles. Ces éléments comprennent les plasmides de réponse aux

phéromones qui codent souvent pour de nombreux facteurs de virulence, mais également pour de la résistance aux antibiotiques.

1.3.1.4 Substance agrégative

La substance agrégative (SA) a été la première protéine de surface LPXTG décrite chez les entérocoques et est une adhésine bien caractérisée pour ses nombreuses fonctions et sa contribution dans la virulence d'*E. faecalis*. SA est la désignation communément utilisée pour un groupe de protéines codées par des plasmides conjugatifs répondant aux phéromones dont leur séquence en acides aminés est hautement similaire. Les gènes *aspI*, *asc10* et *asaI* codent pour les protéines SA de trois plasmides répondant aux phéromones les plus étudiés, soient pPD1, pCF10 et pAD1 respectivement. L'expression de ces gènes est induite par une phéromone oligopeptide autocrine, laquelle est sécrétée par d'autres entérocoques [155, 156]. L'expression de la SA à la surface de la cellule permet un contact physique étroit entre les bactéries donneuses et receveuses, permettant ainsi un transfert, à haute fréquence, de plasmides de virulence et de résistance aux antibiotiques. L'adhésine, de 1296 acides aminés, contient un domaine d'agrégation à l'ALT, une région variable, un domaine central d'agrégation et deux motifs Arg-Gly-Asp (RGD) (Figure 3). Elle contient également une hélice alpha ayant une similarité avec la protéine M de *Streptococcus pneumoniae* et à la myosine des cellules eucaryotes [157].

Figure 3. Organisation structurale générale des SA des entérocoques (adapté de [101, 158-161]).



Les trois protéines SA partagent au-delà de 90% d'identité en acides aminés à travers toute la séquence, bien qu'une région variable, localisée au centre, présente seulement 30 à 40% de similarité [161]. Les études biochimiques sur la SA ont longtemps été difficiles dues aux contraintes liées à la purification de la protéine à sa pleine longueur. Il semblerait que la partie C-terminale soit rapidement dégradée suite à la purification et donc peu stable [162]. De plus, il n'est pas rare d'observer plusieurs conformations de la protéine mature sur gel SDS-PAGE selon la méthode d'extraction, la température de dénaturation et les conditions de migration. Cette flexibilité observée pourrait être due à l'absence de résidus cystéine dans les 1296 acides aminés de la protéine [162]. Il a été démontré, par mutations et délétions, que deux domaines d'agrégation seraient présents et nécessaires à l'agrégation. Spécifiquement, le premier domaine, allant des acides aminés 156 à 358, permettrait en partie la liaison à l'ALT tandis que le second domaine, allant des acides aminés 473 à 683, serait nécessaire à la formation d'agrégats mais non à la liaison à l'ALT. De plus, une délétion dans le premier domaine d'agrégation (a.a. 156 à 358) a révélé que celui-ci était requis, non seulement pour la liaison à l'ALT, mais également pour l'internalisation dans des entérocytes H-29 [160]. Suivant cette observation, un fragment N-terminal purifié, allant des acides aminés 44 à 331, a démontré une forte liaison à l'acide lipotéichoïque [160]. De plus, cette étude a mis en évidence que la purification de l'Asc10 pleine longueur et du domaine d'agrégation à l'ALT, situé près de la région N-terminale d'Asc10, liaient l'acide lipotéichoïque d'*E. faecalis* de façon dose-dépendante, contrairement au domaine central [160]. La structure cristalline de SA n'a pas encore été déterminée et donc, le mécanisme par lequel SA se lie à son ligand n'est pas encore connu. La SA est aussi impliquée dans l'adhésion et l'invasion de cellules dérivées du colon et du duodénum, indiquant que SA peut jouer un rôle dans la translocation d'*E. faecalis* à travers la barrière intestinale, conduisant ainsi à une infection systémique [163, 164]. Asc10 augmente l'adhérence, l'internalisation et la survie intracellulaire dans les leucocytes PMNs [165, 166]. Ces observations semblent ainsi suggérer que les motifs RGD de SA favoriseraient les interactions avec les cellules eucaryotes. Cela semble être confirmée par une diminution de la liaison des *E. faecalis* lorsque des cellules eucaryotes sont pré-

incubées avec des peptides RGDS synthétisés chimiquement ou avec des anticorps monoclonaux au récepteur du complément de type 3 (CR3), CD47 (protéine associée à l'intégrine) et la L-sélectine [166, 167]. De façon similaire, Asa1 augmente l'adhérence et la survie dans les macrophages et favorise l'adhérence aux cellules épithéliales des tubules rénaux [167].

Les protéines Asc10 et Asa1 ont été impliquées dans la liaison aux CMEs, tels que la fibrine, la fibronectine, la thrombospondine, la vitronectine et le collagène de type I. Des délétions dans la région variable du gène *asa1* ont engendré une réduction de la liaison à la fibronectine, suggérant ainsi que cette région est un domaine de liaison aux CMEs [168]. Par contre, Asc10 purifiée pleine longueur ne s'est pas liée aux CMEs, mais un mutant de la protéine n'ayant pas le domaine d'agrégation en N-terminale (a.a. 156-358) s'est lié au fibrinogène et à la vitronectine. De plus, une souche d'*E. faecalis* contenant le plasmide pCF500, un dérivé de pCF10 (SA positif inductible), a été incapable de coloniser le tractus urinaire dans un modèle d'infection du tractus urinaire supérieure et inférieure chez la souris [169]. Par contre, Asc10 et Asa1 sembleraient jouer un rôle dans une endocardite expérimentale, puisque les deux protéines auraient augmenté la colonisation bactérienne sur des valves aortiques de lapins [170]. Également, l'utilisation de mutants du gène *asc10* par délétion du domaine d'agrégation en N-terminale et des motifs RGD, a montré une diminution significative de la virulence dans un modèle d'endocardite du lapin. À l'opposé, l'immunisation active avec des fragments N-terminaux de SA n'a pas permis d'obtenir de protection immunitaire dans ces modèles d'endocardites [171]. Ainsi, les observations tant *in vitro* qu'*in vivo* indiquent que la SA est multifonctionnelle et est un facteur de virulence important chez *E. faecalis*, tant au niveau des infections que dans le transfert horizontal d'éléments de virulence et de résistance aux antibiotiques.

1.3.2 Facteurs sécrétés

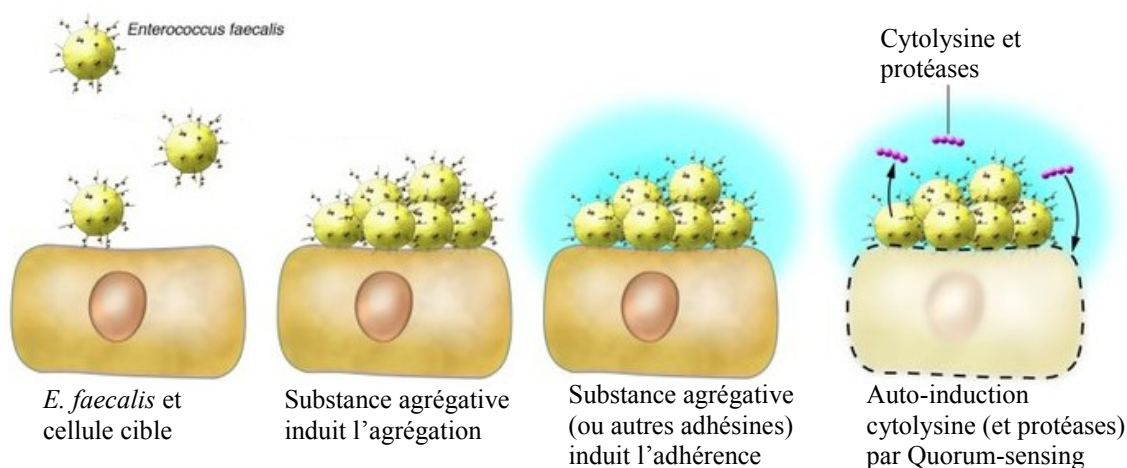
1.3.2.1 Cytolysine

La cytolysine, aussi nommée hémolysine, est une toxine bactérienne, dont les gènes permettant sa production sont localisés sur des plasmides répondant aux phéromones [172] ou sur un îlot de pathogénie présent dans le chromosome [173]. La cytolysine

active consiste en deux petits peptides ($CylL_1$ et $CylL_s$). Lorsque fonctionnels, ils sont toxiques ou lytiques pour une grande variété de cellules eucaryotes et procaryotes [174].

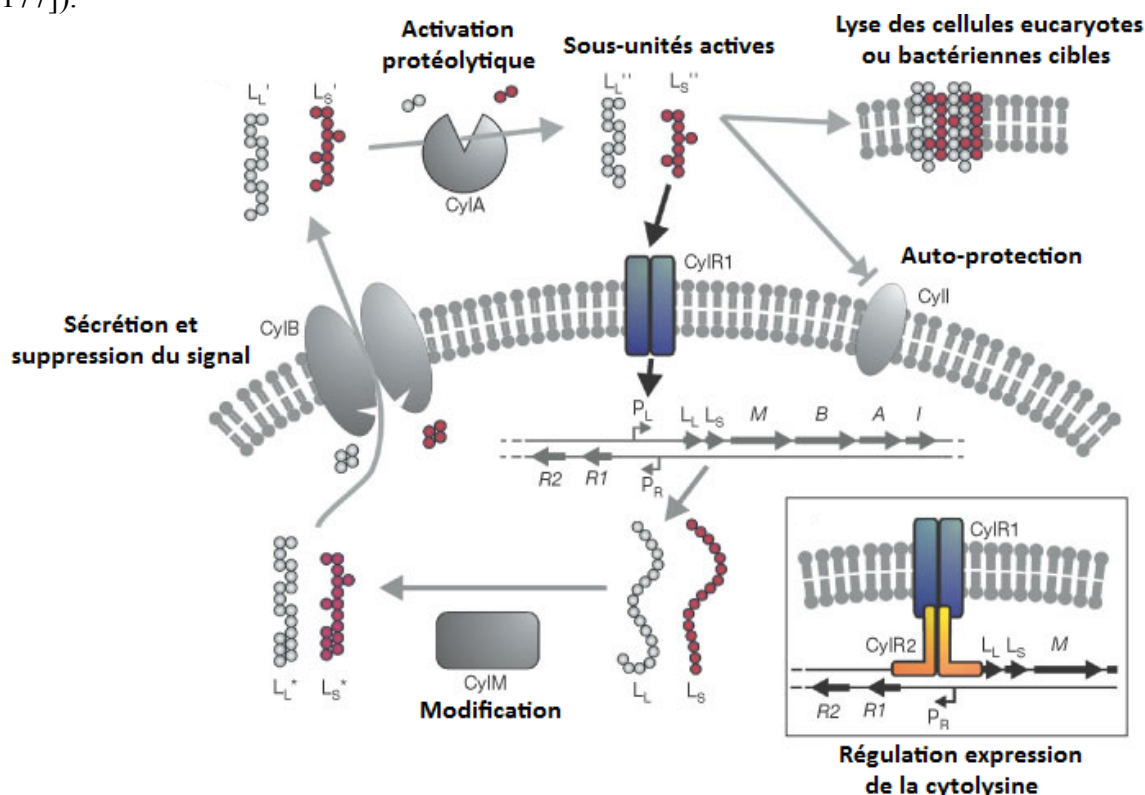
En plus de posséder des activités toxiques et bactéricides, la forme extracellulaire activée de $CylL_s$ ($CylL_s''$) induit un haut niveau d'expression des gènes structuraux de la cytolyse via un mécanisme de quorum-sensing impliquant un système à deux composantes [175]. Elle est codée par un opéron complexe de huit gènes (*cylL_i*, *cylL_s*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *cylI*, *cylR1*, *cylR2*). Les protéines de régulation de la cytolyse, CylR1 et CylR2, répriment, par collaboration, l'expression de la toxine; tandis que l'activation est enclenchée par l'accumulation externe de $CylL_s''$ via un mécanisme de signalisation inconnu [175]. La figure 4a démontre l'auto-induction de la cytolyse par le mécanisme de quorum-sensing impliquant également la SA et autres adhésines.

Figure 4a. Modèle d'auto-induction de la cytolyse par synergie avec la SA et autres adhésines (adapté de [176, 177]).



Ensuite, la figure 4b démontre la maturation et la régulation de la toxine suite à son auto-induction.

Figure 4b. Modèle de maturation et de régulation de la cytolysine (adapté de [175, 177]).



Suite à l'auto-induction, les sous-unités $CylL_L$ et $CylL_S$ sont synthétisées pour ensuite être modifiées de façon post-traductionnelle par $CylM$. Les peptides modifiés, $CylL_L^*$ et $CylL_S^*$, sont clivés et sécrétés par $CylB$ suivi d'une activation extracellulaire par une seconde protéase, $CylA$. La bactérie produisant la cytolysine est protégée par $CylI$ dont le mécanisme est encore inconnu. La sous-unité $CylL_S''$ induit l'expression de l'opéron cytolysine, et $CylR1$ et $CylR2$ sont tous les deux requis pour la répression (voir l'encadré figure 4b). Dans un modèle plus simple, $CylL_S''$ pourrait interagir avec la protéine régulatrice $CylR1$ à la surface de la membrane de par sa composition hydrophobe. $CylR1$ pourrait ensuite permettre à la protéine de liaison à l'ADN, $CylR2$, de réprimer la transcription à partir du promoteur de la cytolysine P_L étant dans un état inactivé. Puisqu'aucun autre élément de régulation n'est codé par l'opéron, on ne peut

exclure la possibilité que d'autres facteurs cellulaires puissent jouer un rôle dans le processus de signalisation [178].

La cytolysine est retrouvée chez au-delà de 60% des isolats *E. faecalis* de cas cliniques [93]. Elle est reliée de manière distante à la streptolysine S et est aussi membre de la classe des bactériocines connue sous le nom des « lantibiotiques » [17]. La cytolysine des entérocoques a démontré un rôle dans la virulence de différents modèles d'infections [179-184] et est associée à la mortalité chez l'homme [185]. Le phénotype cytolytique est commun chez les isolats d'*E. faecalis* dérivés d'infections nosocomiales [186]. Lors d'une infection aiguë, le traitement aux antibiotiques face à la bactérie semble peu efficace dû à une translocation de la bactérie dans les cellules épithéliales de l'intestin de l'hôte [187]. Par contre, il n'est pas démontré si la toxine affecte la translocation bactérienne dans l'épithélium intestinal. Il a été observé que les souches exprimant la cytolysine avaient un avantage sur celles ne l'exprimant pas, car la toxine permettait une surcroissance des isolats *E. faecalis* cytolytiques [188]. De plus, il n'a pas été démontré si l'expression de la toxine permettait une translocation de la bactérie dans la circulation sanguine. Par contre, on sait qu'elle contribue à la prolifération d'*E. faecalis* dans le sang [23]. Considérant le mode d'auto-régulation de la cytolysine, requérant une accumulation de CylL_S à un niveau seuil, la diffusion dans la circulation sanguine pourrait prévenir un haut niveau d'expression dans ce milieu, rendant ainsi une hémolyse sanguine élevée peu probable. Cependant, aux sites de coagulation intravasculaire, dans l'environnement des valvules cardiaques, ou dans les biofilms, des microenvironnements peuvent apparaître où *E. faecalis*, et ainsi CylL_S, peut s'accumuler à des concentrations suffisamment élevées pour enclencher l'expression à haut niveau de la cytolysine [177].

1.3.2.2 Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens extracellulaires qui démontrent une activité envers des espèces bactériennes étroitement liées. Quatre gènes sont nécessaires afin de produire les bactériocines : un gène de structure codant pour un pré-peptide, un gène d'immunité (auto-protection), un gène de transporteur ABC et un gène codant pour une protéine requise à l'exportation de la bactériocine. Les

bactériocines sont formées en tant que pré-peptide dans la cellule et la maturation se fait durant l'exportation. Cette dernière se fait par le clivage enzymatique du peptide leader en N-terminale au niveau d'un site double glycine, et par l'exportation via une voie Sec-dépendante. Les bactériocines sont des protéines cationiques et amphiphiles contenant peu ou pas de cystéine [189]. La production des bactériocines est favorisée en conditions de stress, causée probablement par un taux de croissance moindre, résultant ainsi en une meilleure utilisation de l'énergie et une plus grande disponibilité des métabolites pour la synthèse des bactériocines. Ainsi, sous des conditions optimales de croissance, il y a moins d'acides aminés disponibles pour la production de celles-ci [190]. Les espèces *Enterococcus* sont connues pour produire une grande variété d'entérocinés (Tableau IV) incluant les entérocinés A, B et P, lesquelles sont actives contre les espèces *Listeria*, *Clostridium* et *Staphylococcus aureus* [191]. La plupart des bactériocines produites par *E. faecalis* et *E. faecium* sont identiques aux entérocinés A et B étant les premières décrites chez *E. faecium* CTC492 et *E. faecium* T136 [192]. *E. faecium* RZS C5 est un isolat naturel du fromage, ne possède pas de facteurs de virulence et a des propriétés anti-*Listeria* spp. [193]. L'étude énonce la possibilité d'utiliser cette souche en co-culture, par exemple dans la production de saucisses fermentées, afin de réduire le risque de croissance de *Listeria* spp.. L'entérocline EJ97 d'*E. faecalis* S-47 a aussi démontré des propriétés anti-*Listeria* spp., avec une réduction de 1.6 log₁₀ après 6 heures et une inhibition complète après 24 heures à une concentration de 20 U/ml [194]. L'entérocline AS-48 (produite par *E. faecalis* A-48-32) inhibe la croissance de cellules végétatives de *Bacillus coagulans* dans des conditions de réfrigération, et à hautes températures dans des conserves de fruits et de légumes [195]. L'activité des bactériocines envers des bactéries à Gram-négatif est plutôt inhabituelle, mais la bactériocine ST15 d'*E. mundtii* semble efficace contre une variété de bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif telles que *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* et *Pseudomonas* [192]. Les effets bactéricides des bactériocines semblent être dus à la perméabilisation de la paroi cellulaire. La structure enroulée des peptides entrant en contact avec la paroi cellulaire, formerait une hélice, qui s'incorporerait et traverserait la membrane, créant ainsi un pore. Ce mode d'action a été observé avec l'entérocline P. Le pore résultant cause un relâchement des ions K⁺, une perte du potentiel membranaire et une inhibition

de l'absorption des acides aminés. Tout ceci aurait pour résultat la mort cellulaire [189, 196]. Une nouvelle bactériocine, la bactériocine 51, isolée de la souche clinique résistante à la vancomycine *E. faecium* VRE38 et codée sur le plasmide mobile pHY (6kb), a été récemment caractérisée [197]. La bactériocine 51 (Bac 51) démontre une activité à spectre plutôt étroit et est active contre les souches *E. faecium*, *E. hirae* et *E. durans*. Contrairement à l'effet bactéricide produit par les bactériocines formatrice de pores Bac 31, Bac 32 et Bac 43, le mode d'action de la bactériocine 51 est bactériostatique [197]. Cette dernière a été identifiée chez des isolats *E. faecium* cliniques à une fréquence de 2%, mais elle n'a pas été détectée chez des isolats cliniques *E. faecalis*. Ceci semble indiquer que Bac 51 est spécifique aux isolats cliniques *E. faecium*.

Tableau IV. Bactériocines produites par *Enterococcus* spp. (adapté de [192, 197-201]).

Bactériocine	Souche productrice	Origine	Taille (Da)
Entérocinés A et B	<i>E. faecium</i> P21	Chorizo	-----
Entérociné AJ97	<i>E. faecalis</i> S-47	-----	-----
Sans nom	<i>E. faecium</i> A2000	Fromage	-----
Entérociné CRL35	<i>E. faecium</i> CRL35	Fromage	3500
Bactériocine N15	<i>E. faecium</i> N15	Riz de son Nuka	3000-5000
Entérocinés A et B	<i>E. faecium</i> WHE81	Fromage	4833 et 5462
Sans nom	<i>E. faecium</i> RZS C5; <i>E. faecium</i> DPC 1146	-----	-----
AS-48	<i>E. faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i> S-48	Tractus intestinal porcin	-----
Entérociné 012	<i>E. gallinarum</i>	Duodénum d'autruche	3400
Sans nom	<i>E. faecium</i> CRL1385	Poulet libre de ferme	-----
Entérociné P	<i>E. faecium</i> P13	Saucisson sec fermenté	-----
Entérocinés 1071A et 1071B	<i>E. faecalis</i> BFE 1071	Fèces de porcs miniatures	4285 et 3899
Mundticine ATO6	<i>E. mundtii</i> ATO6	Légumes	4287
Mundticine KS	<i>E. mundtii</i> NFRI 7393	Ensilage de graminées	4290
Bactériocine 51	<i>E. faecium</i> VRE38	Humain (clinique)	-----
Cytolysine	<i>E. faecalis</i> DS16; <i>E.</i> <i>faecium</i> 228	Humain (clinique)	-----
Bactériocine 21	<i>E. faecalis</i> 39-5	Humain (clinique)	-----
Bactériocine 31	<i>E. faecalis</i> YI717	Humain (clinique)	4730
Bactériocine 32	<i>E. faecium</i> VRE200	Humain (clinique)	5940
Bactériocine 43	<i>E. faecium</i> VRE82	Humain (clinique)	4840

1.3.2.3 Hyaluronidases, gélatinase et sérine protéase

Les facteurs sécrétés comprennent également la gélatinase, la sérine protéase et le gène *fsr* nécessaire à leur régulation. Ces facteurs sont généralement connus pour leur fonction à procurer des nutriments nécessaires à la bactérie, mais parfois, ces protéases peuvent causer des dommages aux tissus de l'hôte et ainsi devenir des facteurs de virulence. Ils auraient également une fonction au niveau de la formation de biofilm [202]. Les effets potentiels chez l'hôte incluent : i) une dégradation indirecte des tissus conjonctifs par l'activation des métalloprotéases de la matrice de l'hôte, ii) une dérégulation des mécanismes critiques de l'hôte facilitant ainsi l'invasion et la survie de la bactérie, et iii) une dérégulation des composantes clés du système immunitaire de l'hôte par la dégradation des immunoglobulines ou des composantes de la voie du complément [203, 204]. D'autres effets ayant été décrits, sont la dégradation de protéines spécifiques de l'hôte résultant en la production de toxines [205], l'activation directe ou indirecte de virus [206], la transformation d'autres facteurs de virulence bactériens [207], la médiatisation directe d'une dégradation des tissus conjonctifs de l'hôte ou de protéines présentes dans les tissus [208] et finalement, par la démonstration de leur rôle comme facteurs de virulence lors d'expérimentations animales [209].

La gélatinase est une zinc métallo-endoréptidase extracellulaire sécrétée par *E. faecalis* [172]. L'enzyme gélatinase, codé par le gène *gelE*, est capable d'hydrolyser certaines composantes telles que la gélatine, le collagène, la caséine, la lactoglobuline et d'autres petits peptides [210]. Le gène est localisé sur le chromosome et est régulé de façon dépendante de la densité cellulaire. Par comparaison avec d'autres protéases, la gélatinase aurait un rôle dans l'inhibition des activités protéolytiques à l'intérieur de la cellule, mais sa fonction exacte reste encore à déterminer. Une étude a démontré que l'enzyme permettrait de dégrader les SA mal repliées à la surface de la bactérie en plus de réduire le titre de phéromone produit ce qui aurait pour effet de diminuer la capacité d'induction de la conjugaison répondant aux phéromones. De plus, la gélatinase pourrait contrôler la longueur des chaînes de bactéries formées grâce à l'activation d'une autolysine. *GelE* serait également essentiel pour la dégradation de fibrine polymérisé. Ainsi, ces différentes fonctions suggèrent que *GelE* agit afin d'augmenter la dissémination d'*E. faecalis* dans des environnements à haute densité cellulaire [211]. De

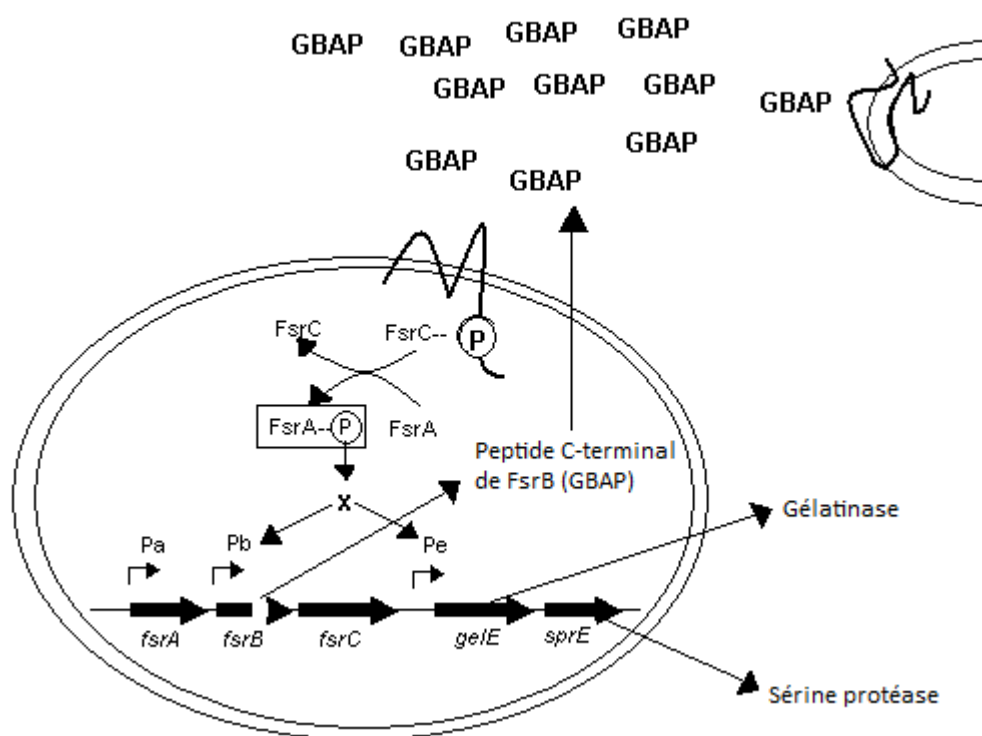
plus, la participation de GelE dans l'activation d'une autolysine, une enzyme dégradant le peptidoglycan, apporterait un relâchement d'ADN extracellulaire et favoriserait la formation de biofilm [212]. Une étude de Kuhnen et al. [213] a montré qu'approximativement 72% des isolats *E. faecalis* provenant d'hôpitaux étaient producteurs de gélatinase, ce qui pourrait montrer un rôle de celle-ci dans les infections à entérocoques. Plusieurs études ont démontré son implication dans la sévérité des endocardites [214, 215]. D'un autre côté, une absence du phénotype Gel dans 46% des souches isolées d'endocardites a été observée, ce qui montre que l'enzyme ne semble pas non plus essentiel dans la pathogénèse de cette maladie [216]. Par contre, une étude récente [217] a comparé le potentiel pathogénique de la souche résistante à la vancomycine *E. faecalis* V583 et trois mutants isogéniques (mutants $\Delta gelE$, $\Delta sprE$ et $\Delta gelE\Delta sprE$) dans un modèle d'infection à endocardite chez le lapin. Le mutant $\Delta gelE$ a engendré une réduction de la colonisation bactérienne sur les valves aortiques comparativement à la souche V583 ou même le mutant $\Delta sprE$. Ainsi, les auteurs de cette étude suggèrent que la gélatinase est la principale responsable de la pathogénèse dans une endocardite à entérocoques [217]. Chez *E. faecium*, une étude a démontré que seulement quelques isolats semblaient posséder le gène *gelE*, mais après quelques repiquages, le gène était perdu laissant suggérer que ce dernier n'est pas conservé chez l'espèce *E. faecium* [216]. Par contre, une autre étude a démontré une prévalence différente du gène chez des isolats cliniques d'*E. faecium* d'origine humaine [116]. Une forme « silencieuse » ou non-exprimée du gène *gelE* a également été décrite chez cette espèce bactérienne [218].

Une région suite au gène *gelE* a été séquencée et fut déterminée comme étant une sérine protéase, SprE. Tous les isolats d'entérocoques possédant la gélatinase furent également positifs pour la protéine SprE et vice versa [219, 220]. Il a été démontré également qu'une mutation au niveau du gène *gelE* provoquait l'arrêt de production de l'ARNm *sprE*. Par contre, une mutation du gène *sprE* affecte l'activité de la sérine protéase mais ne change en rien celle de la gélatinase, ce qui démontre que la sérine protéase ne semble pas jouer un rôle important lors d'une infection [220].

Trois autres cadres de lecture ont été identifiés précédant le gène *gelE* dans des souches d'*E. faecalis* et furent nommés *fsr* (« faecal streptococci regulator ») [220]. Ce

locus *fsr* comporte trois gènes soient *fsrA*, *fsrB* et *fsrC*. Ce dernier possède des similarités avec le locus *agr* (accessory gene regulatory) des staphylocoques [221]. Chez *S. aureus* le système de quorum-sensing *agr* a démontré la capacité de sur-réguler l'expression de plusieurs protéines sécrétées, incluant des toxines et une sérine protéase, et de sous-réguler l'expression de protéines de surface telle que la protéine A [222-224]. L'expression du locus *fsr* est dépendante de la densité cellulaire (quorum-sensing) et semble posséder un système de régulation à deux composantes [220]. La figure 5 illustre bien le fonctionnement du système de régulation *fsr*, le rôle de chacune des composantes et l'expression de celles-ci.

Figure 5. Mécanisme d'activation du système de régulation *fsr* et ses effets sur la synthèse de la gélatinase et de la sérine protéase (adapté de [177]).



Légende : *Pa*, promoteur du gène *fsrA*; *Pb*, promoteur des gènes *fsrB* et *fsrC*; *Pe*, promoteur des gènes *gelE* et *sprE*; GBAP, Peptide C-terminal de FsrB.

Les gènes *fsr* semblent jouer un rôle dans la formation de biofilm, puisque des mutations dans les gènes *fsrA*, *fsrB* et *fsrC* chez un isolat *E. faecalis* a permis de démontrer une réduction dans la production de biofilm de 28 à 32% comparativement à la souche contrôle sauvage [202].

Finalement, les espèces *Enterococcus* peuvent également sécréter un enzyme hydrolytique nommé hyaluronidase. L'hyaluronidase agit sur l'acide hyaluronique et est un enzyme de dégradation associé aux dommages tissulaires. L'enzyme dépolymérise la fraction mucopolysaccharidique des tissus conjonctifs, facilitant par le fait même la dissémination des entérocoques, ainsi que leurs toxines, à travers les tissus de l'hôte [144]. L'hyaluronidase est codé par le gène *hyl* présent sur le chromosome. Une étude a démontré que, sur 26 isolats cliniques *E. faecium* résistants à la vancomycine, sept (27%) portaient le gène *hyl*, contrairement à 14% chez les isolats fécaux [225]. De plus, une étude récente a démontré une dissémination générale du gène de virulence *hyl* sur des mégaplasmines de souches *E. faecium* CC17 [226]. Ils ont analysé la présence et la localisation du gène *hyl* chez 255 souches *E. faecium* isolées de patients hospitalisés à Madrid en Espagne. Ils ont constaté que la plupart des isolats contenaient de larges plasmides (>150kb). Tous les isolats positifs pour le gène *hyl* sauf un, appartenaient au sous-groupe polyclonal CC17. La présence de mégaplasmines ayant le gène *hyl* chez des souches CC17 a été documentée en Europe, en Australie, en Asie et en Afrique depuis le milieu des années 90 [226].

1.3.2.4 Production de superoxide extracellulaire

L'anion superoxide est un radical de l'oxygène hautement réactif impliqué dans les dommages aux cellules et aux tissus dans une variété d'infections, incluant les maladies inflammatoires. L'anion superoxide et d'autres radicaux de l'oxygène exercent un effet destructeur sur une grande variété de composés biologiques tels que les lipides, les protéines et les acides nucléiques [227]. Le superoxide est produit par les neutrophiles et autres cellules phagocytaires. En plus d'être produit par les cellules de l'hôte, les bactéries peuvent également produire l'anion superoxide. La production de superoxide extracellulaire a été rapportée comme étant une caractéristique commune chez les souches d'*E. faecalis*. Parmi un total de 91 isolats cliniques, 87 produisaient

l'anion superoxide extracellulaire à un niveau détectable [228]. Les isolats associés aux bactériémies et aux endocardites produisent du superoxide extracellulaire de façon significativement plus élevée que ceux isolés de selles d'individus sains [228]. Dans un modèle d'infection mixte sous-cutanée, *E. faecalis* et *Bacteroides fragilis*, la production de superoxide extracellulaire par *E. faecalis* a permis d'améliorer sa survie *in vivo* [229].

1.3.3 Capsule et paroi cellulaire polysaccharidique

Les composantes de la paroi cellulaire qui sont nécessaires aux interactions complexes entre la bactérie et le système immunitaire de l'hôte, sont considérées comme étant des facteurs de virulence [230]. Il y a deux types d'antigènes polysaccharidiques : les antigènes spécifiques à l'espèce et les antigènes variant en composition et en structure au niveau d'une même espèce. Ce dernier type est utilisé dans les réactions d'agglutination à des fins de sérotypage pour des études épidémiologiques [231].

Des études ont démontré que le complément était un facteur majeur dans l'opsonisation d'*E. faecalis* et que l'utilisation d'anticorps spécifiques contribuait à l'opsonisation de la bactérie sans la présence du complément [232]. Ces études suggèrent ainsi un rôle d'une capsule polysaccharidique dans la résistance à la phagocytose. Des anticorps dirigés contre cette capsule ont été utilisés et ont servi à démontrer la présence de celle-ci chez environ un tiers des isolats d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* [233]. De plus, dans le but d'étudier la diversité des polysaccharides capsulaires dans une collection de souches d'*E. faecalis*, Hufnagel et al. [234] ont utilisé quatre sérums spécifiques envers des antigènes polysaccharidiques qui ont été extraits de la membrane de quatre souches prototypes d'*E. faecalis*, nommés CPS-A, B, C et D. Ils ont été capables d'assigner, par ELISA, 55% des 29 souches testées à un des quatre sérotypes. D'un autre côté, des études génétiques sur la production de la capsule ne supportent pas l'idée de quatre sérotypes capsulaires chez *E. faecalis*. Précédemment, il a été démontré que la production de la capsule de sérotype C était dépendante de la présence de neuf cadres de lecture (*cpsC* à *cpsK*) [235]. Par l'utilisation d'un nouveau système génétique, Thurlow et al. [236] ont démontré que sept des neuf gènes de l'opéron *cps* étaient essentiels à la production de la capsule, indiquant que les sérotypes A et B ne produisaient pas de polysaccharides capsulaires puisque des fragments de

l'opéron étaient manquants. Afin de supporter cette observation, ils ont montré que les polysaccharides capsulaires des sérotypes C et D masquaient la détection de l'acide lipotéichoïque par des anticorps d'agglutination. L'implication de la capsule dans la virulence a également été démontrée dans une étude de cas par Bottone [237]. Des cultures d'*E. faecalis* encapsulé, inoculées par voie péritonéale à des souris blanches CD1 âgées de 15 semaines, ont démontré la persistance de la bactérie jusqu'à sept jours post-inoculation. Malgré le fait que la présence de la capsule n'ait pas causé la mortalité, cette dernière aurait retardé l'élimination péritonéale par interférence avec la phagocytose. Finalement, une étude de McBride et al. [238] indiquait que des isolats cliniques de sérotype C possédaient un plus grand répertoire de cassettes de résistance aux antibiotiques et étaient plus susceptibles de posséder plusieurs facteurs de virulence que les autres sérotypes. Cela laisse suggérer que la présence de la capsule est associée à une lignée pathogène d'*E. faecalis* [238, 239].

Un autre type d'antigène a été identifié, faisant partie d'un amalgame de gènes impliqués dans la biosynthèse de polysaccharides, nommé *epa* (enterococcal polysaccharide antigen) [240]. Une étude de caractérisation de cet antigène a pu démontrer, en introduisant le fragment d'ADN d'intérêt dans une souche d'*E. coli*, qu'il y avait expression d'un produit résistant à la protéinase K et que ce produit consistait en un hydrate de carbone. Le séquençage du gène *epa* a permis de démontrer l'implication de ce gène dans la biosynthèse et l'exportation de polysaccharides [241]. Xu et al. [241] ont suggéré, par homologie, que le produit de ce gène consistait en un système de transport ABC important dans l'exportation des polysaccharides d'*E. faecalis*. Ce groupe de gènes serait exprimé lors d'infections chez l'homme et permettrait une résistance à la phagocytose.

1.3.4 Biofilm

Durant les dernières années, plusieurs déterminants génétiques impliqués dans la formation de biofilm ont été identifiés chez les entérocoques. La prévalence dans la formation de biofilm varie d'un pays à l'autre. Cela semble dépendre de la souche isolée et de ses facteurs de virulence, ainsi que l'espèce. Également, la formation de biofilm dépend de l'origine d'isolement (environnement, alimentaire ou clinique, et si clinique,

le type d'infections). À Rome, en Italie, 80 % des isolats *E. faecalis* et 48 % des isolats *E. faecium* provenant de patients infectés étaient capables de former des biofilms [242]. À Pamplona, en Espagne, 57 % d'isolats *E. faecalis* dérivés de différents isolats cliniques produisaient des biofilms [243]. À Sardaigne, en Italie, la production de biofilm a été détectée chez 87 % d'isolats cliniques *E. faecalis* et chez 16 % des isolats cliniques *E. faecium* [244]. Au Royaume-Uni, parmi 109 isolats sanguins d'entérocoques, 100 % des isolats *E. faecalis* et 42 % des *E. faecium* produisaient des biofilms [245]. Collectivement, ces données suggèrent qu'*E. faecalis* produisent du biofilm plus souvent qu'*E. faecium* et que la formation de biofilm peut être un facteur important dans la pathogenèse des infections à entérocoques. Ainsi, moins d'études ont été effectuées chez l'espèce *E. faecium*.

Une protéine spécifique, la protéine de surface Esp, a démontré la capacité de promouvoir l'adhérence initiale des bactéries à des surfaces abiotiques [243], et d'augmenter la formation de biofilm par les entérocoques [20, 125]. D'autres études suggèrent que le gène *esp* ne semble pas nécessaire ou suffisant pour la production de biofilm chez *E. faecalis* et *E. faecium* [246, 247]. D'autres facteurs de virulence ou des gènes associés à la régulation de la virulence, incluant le gène de la gélatinase (*gelE*), les gènes *fsr* codant pour un système quorum-sensing à deux composantes, le gène de régulation transcriptionnelle *bop* [234], l'hétérogénéité de la charge de surface [248] et le locus *ebp* codant pour un pilus associé aux endocardites et à la formation de biofilm [131], ont montré leur influence dans la formation de biofilm chez *E. faecalis*, et dans certains cas, chez *E. faecium* [202].

Un opéron récemment décrit, conférant un phénotype de formation élevée de biofilm chez *E. faecalis*, est le locus *bee* (« biofilm enhancer in *Enterococcus* ») [132]. Ce groupe de gènes code pour trois protéines ancrées à la paroi cellulaire et deux sortases putatives associés. L'analyse de l'expression des gènes a confirmé le lien transcriptionnel des gènes *bee-1*, *bee-2* et *bee-3*, mais également au niveau des sortases, *srt-1* et *srt-2*. La séquence déduite en acides aminés de chacune des trois protéines Bee a révélé la présence de séquences signal en N-terminale, de motifs LPXTG conservés, suivi d'une région hydrophobe en C-terminale [132]. Cette observation semble confirmer que les trois protéines sont ancrées à la membrane via un mécanisme sortase-

dépendant. Les protéines Bee sembleraient également impliquées dans la formation d'un pilus [249]. Le développement d'un biofilm par *E. faecalis* serait enclenché par l'expression des gènes du locus *bee* dû à la formation de structures de type pilus, mais cette hypothèse reste encore à confirmer.

1.4 Microorganismes indicateurs de résistance aux antibiotiques

E. faecalis et *E. faecium* ont le potentiel de se disséminer facilement à travers la chaîne alimentaire, de contaminer l'eau et l'environnement [14]. Ils sont habituellement retrouvés en très grand nombre dans les aliments d'origine animale tels que les carcasses de bœuf, de porc et de volaille indiquant ainsi une contamination fécale [15, 57]. De plus, ils possèdent une très grande capacité d'acquisition et de transfert de la résistance aux antibiotiques [50]. Toutes ces caractéristiques expliquent leur suivi dans les programmes de surveillance de l'antibiorésistance en tant qu'indicateurs de résistance aux antibiotiques pour les bactéries à Gram-positif.

1.4.1 Programmes de surveillance de l'antibiorésistance

Le potentiel de transmission des bactéries entériques zoonotiques résistantes aux antimicrobiens, de l'animal de consommation à la population humaine, est un problème de santé publique depuis plusieurs décennies. Les bactéries, possédant des gènes de résistance aux antibiotiques et retrouvées dans le tractus intestinal des animaux de consommation, peuvent contaminer les carcasses lors de certaines étapes associées au processus d'abattage et causer des maladies d'origine alimentaire qui peuvent ne pas répondre aux traitements antimicrobiens [250]. De plus, les gènes de résistance aux antibiotiques, générés et/ou amplifiés au niveau de la ferme, peuvent interférer avec l'efficacité thérapeutique et être par la suite transférés à d'autres animaux ou humains par contact direct, par contamination de la viande ou, plus indirectement, via l'environnement tel que par l'application des boues d'épuration sur les sols agricoles à des fins d'irrigation et de fertilisation [251]. Un autre exemple de contamination par l'environnement consiste à des vecteurs mécaniques tels que les distributeurs d'eau chez les producteurs d'animaux. Ainsi, les programmes qui visent la surveillance de la résistance aux antimicrobiens des bactéries associées aux toxi-infections alimentaires,

mais également celles de la flore commensale, sont essentiels. Plusieurs pays et organisations ont implanté des programmes de surveillance nationale de la résistance aux antimicrobiens (Tableau V).

Tableau V. Principaux programmes de surveillance nationale de la résistance aux antimicrobiens (Selon [250]; Sites Internet et rapports publiés).

Pays ou organisations	Programmes
Organisation mondiale de la santé (OMS)	ARM (Antimicrobial Resistance Management)
Union Européenne	EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System)
Canada	PICRA (Programme Intégré Canadien de surveillance de la Résistance aux Antimicrobiens)
États-Unis	NARMS (National Antimicrobial Resistance Monitoring System)
France	FARM (French Antimicrobial Resistance monitoring)
Danemark	DANMAP (Danish integrated Antimicrobial resistance Monitoring and research program)
Espagne	VAV (Veterinary Monitoring of Antimicrobial resistance in Spain)
Pays-Bas	MARAN (Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic usage in Animals in the Netherlands)
Norvège	NORM-VET (Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway)
Suède	SVARM (Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring)
Italie	ITAVARM (Italian Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring)
Grèce	GSSAR (Greek System for the Surveillance of Antimicrobial Resistance)
Finlande	FINRES-Vet (Finnish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring and Consumption of Antimicrobial Agents)
Irlande	SARI (Strategy for the control of Antimicrobial Resistance in Ireland)
Allemagne	GERMVET (German Veterinary national Resistance Monitoring program)
Japon	JVARM (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System)
Australie	AGAR AMR Surveillance (Australian Group on Antimicrobial Resistance)

Si on regarde de plus près le programme de surveillance implanté au Canada, le PICRA [252], il permet de surveiller à l'échelle nationale l'utilisation des antimicrobiens et l'émergence de la résistance chez des bactéries isolées chez l'humain, les animaux ou les aliments. Ainsi, la surveillance se fait à partir des abattoirs, des hôpitaux vétérinaires et humains, de la nourriture pour animaux, de la ferme et des produits vendus au détail. Les données observées sont obtenues grâce à l'utilisation de méthodes standardisées qui peuvent être reliées entre elles afin d'examiner les liens existant entre l'emploi des antimicrobiens chez les animaux de consommation et chez les humains, et leur impact sur la santé. Les rapports publiés permettent d'arriver à l'élaboration de politiques basées sur la science afin de contrôler l'emploi des antimicrobiens dans les hôpitaux, la communauté et l'agriculture pour ainsi prolonger leur efficacité. Ils permettent également de prendre des mesures appropriées pour limiter l'émergence et la propagation de la résistance bactérienne entre les animaux, les aliments et l'humain.

La résistance aux antimicrobiens surveillée chez les entérocoques varie selon les antibiotiques nouvellement utilisés et selon les animaux de consommation. Dans les rapports du PICRA, les entérocoques sont isolés à la ferme pour le porc, et la viande au détail est utilisée pour le poulet. Les antibiotiques sélectionnés et testés ont été choisis en tant que représentants des différentes classes structurales et peuvent varier au fil des années. Ces derniers inclus : la ciprofloxacine, l'érythromycine, la gentamicine, la quinupristine-dalfopristine, la streptomycine, la tétracycline et la tylosine (<http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/pdf/cipars-picra-2007-eng.pdf>). Selon le lieu d'isolement et l'espèce animale, d'autres antibiotiques sont également surveillés : la daptomycine, le linezolide, la tigécycline, la vancomycine, la kanamycine, la lincomycine, la pénicilline, le chloramphénicol, la nitrofurantoïne et la flavomycine. Chez les entérocoques, les seules espèces identifiées sont *E. faecalis* et *E. faecium*, tandis que les espèces non-identifiées sont regroupées pour les résultats.

1.4.2 Méthodes phénotypiques de détection de la résistance aux antibiotiques

Pendant plusieurs années, controverse et confusion entouraient les tests de susceptibilité aux antibiotiques pour les isolats d'entérocoques, particulièrement au niveau des méthodes phénotypiques pour la détection de la résistance élevée envers les

aminoglycosides et de la résistance à la vancomycine. Les résultats de plusieurs études, dans l'évaluation de différentes méthodes et des critères d'interprétation, ont permis la suggestion de techniques plus précises. Des lignes directrices, continuellement mises à jour pour la sélection des agents antimicrobiens qui devraient être considérés pour les essais routiniers et les rapports rédigés, sont publiées par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (M100-S20, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing) [253].

De très nombreuses techniques sont réalisables pour évaluer *in vitro* l'activité des antibiotiques; elles sont toutes basées sur la détermination des concentrations minimales bactériostatiques et bactéricides [254]. Ces techniques sont de plus en plus standardisées par des comités de réflexion dans chaque pays. Au cours des dernières années, une harmonisation entre ces différents pays a été faite [255]. Ces méthodes, permettant de déterminer le profil de sensibilité des bactéries à différents antibiotiques, donnent des réponses sous forme qualitative : sensible, intermédiaire et résistant. Elles résultent d'une détermination semi-quantitative du pouvoir bactériostatique des antibiotiques. Deux mesures sont à la base de toutes les techniques d'étude de l'activité des antibiotiques. Il y a tout d'abord la CMI (concentration minimale inhibitrice) qui consiste en la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 heures de culture à 35°C. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique. Ensuite, il y a la CMB (concentration minimale bactéricide) qui est la plus petite concentration d'antibiotique laissant 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 35°C. Différentes techniques sont possibles, soient en milieu gélosé par diffusion avec des disques chargés en antibiotique (antibiogramme), soient en milieu liquide avec différentes concentrations d'antibiotiques. La méthode de diffusion en gélose consiste à déposer des disques de papier imprégnés d'antibiotiques sur une géloseensemencée avec la bactérie à étudier. Il s'établit dans la gélose un gradient de concentration d'antibiotique autour de chaque disque. Après 18 heures d'incubation, il se produit un halo d'inhibition autour de chaque disque permettant ainsi de mesurer un diamètre. Ce diamètre reflète la valeur des CMI. La comparaison de ce diamètre aux diamètres standards, publiés dans les différents guides, permet de répondre qualitativement si la souche étudiée est sensible,

intermédiaire ou résistante. L'interprétation de l'antibiogramme ne se limite pas à la lecture d'un seul antibiotique, mais elle est basée sur la lecture comparée de plusieurs molécules d'une même famille d'antibiotiques, voire d'autres familles pour mieux déceler les mécanismes de résistance faiblement exprimés. Il existe également une technique simple d'utilisation en milieu gélosé, l'E-Test, qui utilise des bandelettes avec un gradient continu d'antibiotique, et une échelle de lecture de concentration (http://www.abbiotest.com/bd_products_etest.html). La méthode en milieu liquide consiste en l'utilisation de milieux supplémentés avec une concentration croissante d'antibiotique pour être ensuite inoculés avec une suspension bactérienne ayant une densité optique pré-déterminée (ex. : Standard McFarland 0.5) suivi d'une incubation pendant 24 heures à 35°C. Peu importe la taille de la croissance observée, celle-ci devra être considérée comme une indication de la résistance. Les méthodes en milieu liquide se prêtent à l'automatisation et plusieurs systèmes existent sur le marché (ex. : système ARIS « Sensititre Automated Reading and Incubation System ») (http://www.trekds.com/products/sensititre/vet_aris2x.asp).

Toutes ces techniques ont une certaine limitation étant donné que la résistance envers un seul groupe donné de bactéries est déterminée. Elles sous-estiment donc le nombre de bactéries résistantes dans la communauté présente. Afin d'améliorer l'estimation, il serait mieux d'ensemencer des milieux gélosés supplémentés en antibiotique avec des cultures de bactéries identifiées seulement au genre ou de toucher le centre de plusieurs colonies afin d'obtenir un McFarland 0.5 pour ensuite faire les analyses [256].

1.4.3 Méthodes génotypiques de détection de la résistance aux antibiotiques

Avant l'avènement des techniques moléculaires, et même encore aujourd'hui, les piliers de la détection de la résistance aux antibiotiques étaient, et sont encore, les tests phénotypiques. Des tests de susceptibilité *in vitro* relativement simples ont été développés et permettent habituellement de prédire l'efficacité d'un traitement aux antibiotiques *in vivo*. Dans certains cas, ces tests ne sont pas suffisants. Un exemple est la résistance aux céphalosporines de troisième génération causée par des bêta-lactamases à spectre étendu (ESBLs) souvent associés aux souches de *Klebsiella pneumoniae* et

d'*Escherichia coli*. Les tests de susceptibilité *in vitro* de routine peuvent démontrer une susceptibilité à certains de ces antibiotiques, mais la thérapie a une forte probabilité de ne pas fonctionner et des tests *in vitro* phénotypiques et moléculaires additionnels ont été développés afin de détecter les ESBLs [257, 258].

La méthodologie PCR a rendu possible la détection de chaque gène dont la séquence est connue. En fait, pour tous ou pratiquement tous les gènes de résistance, des tests PCR ont été décrits. Cependant, la disponibilité de nouvelles méthodes moléculaires ne veut pas dire par définition qu'ils sont une amélioration envers les méthodes phénotypiques *in vitro* existantes [259]. Un inconvénient majeur des méthodes moléculaires est que le mécanisme génétique responsable de la résistance doit être connu. Si ce mécanisme n'est pas connu, aucun essai moléculaire approprié ne peut être développé. Il est également important de constater que lorsque les méthodes moléculaires sont utilisées seules, la résistance causée par de nouveaux mécanismes génétiques ne sera pas détectée. De plus, même si la présence d'un gène codant pour de la résistance aux antibiotiques est détectée, celle-ci ne signifie pas nécessairement qu'elle confère un phénotype de résistance [259].

Le PCR est aujourd'hui une méthode faisant partie intégrante des outils moléculaires. Un inconvénient de cette méthode est son extrême sensibilité et donc sa susceptibilité à la contamination et aux résultats faux-positifs. Fréquemment, la détection de multiples gènes peut se faire dans un seul PCR, nommé PCR multiplex [259]. Un nombre de dérivés sur le thème du PCR ont été développés. Le plus commun est le PCR en temps réel (rtPCR). Dans un rtPCR, le processus d'amplification peut être suivi au fur et à mesure, lorsqu'un marqueur fluorescent ou une sonde marquée à un fluorochrome est ajouté à la réaction PCR permettant ainsi de quantifier le nombre d'amplicons générés pendant la réaction [260].

Pratiquement toutes les méthodes moléculaires utilisées pour détecter les gènes de résistance sont basées soit sur l'hybridation, l'amplification ou le séquençage de l'ADN. Par définition, les différents gènes possèdent des séquences d'ADN différentes. En principe, il devrait être possible de sélectionner des séquences d'ADN unique pour des gènes de résistance en particulier, et utiliser l'hybridation pour détecter la présence de ces gènes. Les biopuces utilisent le principe d'hybridation, mais à grande échelle. Les

biopuces utilisent des fragments d'ADN spécifiques pour des gènes d'intérêt ou des oligonucléotides. L'ADN bactérien devant être analysé pour des gènes spécifiques (par exemple les gènes de résistance aux antibiotiques) est marqué et hybridé avec les séquences. Une variation utilise des oligonucléotides sur une biopuce afin de détecter la présence de mutations ponctuelles résultant en un phénotype de résistance. Les biopuces à ADN ont été utilisées avec succès dans différentes études de génotypages et de détection des gènes de résistance aux antibiotiques [261-267]. Récemment, Garneau et al. [266] ont mis au point une biopuce à ADN afin de cibler les gènes de résistance aux antibiotiques acquis étant retrouvés dans un large spectre de bactéries. Cette biopuce contient 182 sondes correspondant à 166 gènes de résistance aux antibiotiques et leurs variants retrouvés dans différentes souches de bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif. Afin de mieux comprendre les mécanismes et l'épidémiologie de la résistance aux antimicrobiens, les éléments génétiques responsables doivent être identifiés. Pour y arriver, Frye et al. [268] ont identifié les gènes de résistance dans la base de données GenBank (NCBI) et les ont compilés en une liste de 775 gènes. Ainsi, une biopuce a été conçue ciblant ces gènes codant pour les résistances envers les aminoglycosides, les bêta-lactamines, les phénicoles, les glycopeptides, les métaux lourds, les lincosamides, les macrolides, les métronidazoles, les polyketides, les ammoniums quaternaires, les streptogramines, les sulfamides, les tétracyclines, et les triméthoprimes ainsi que les gènes responsables du transfert horizontal. Leurs résultats semblent démontrer la possibilité de détecter virtuellement tous les gènes de résistance aux antimicrobiens et ce, peu importe l'espèce bactérienne [268]. Une biopuce à ADN ciblant les gènes des entérocoques (Enteroarray) a été conçue par l'équipe du Dr. Masson [263]. Celle-ci contient des sondes ciblant quatre identifiants taxonomiques à l'espèce qui permettent de discriminer 18 espèces différentes d'entérocoques. D'autres sondes ont été conçues afin d'identifier 18 facteurs de virulence et 174 gènes de résistance aux antibiotiques. Au total, 262 gènes ont été utilisés pour une identification rapide des isolats d'entérocoques, tout en caractérisant leur potentiel de virulence via une identification simultanée des gènes de résistance aux antibiotiques et de virulence endogènes [263].

Par ailleurs, le séquençage de l'ADN reste la méthode standard pour la détection de mutations ponctuelles. Jusqu'à récemment, le séquençage de l'ADN était basé presque exclusivement sur la méthode développée par Sanger. Le principe de cette méthode consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'une amorce complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. Une nouvelle méthode est le pyroséquençage [269]. Les nucléotides sont ajoutés séquentiellement dans le processus. Lorsque le premier des quatre nucléotides est complémentaire à la matrice d'ADN, l'ADN polymérase va l'incorporer dans le nouveau brin. Ainsi, une molécule de pyrophosphate est relâchée pour chaque nucléotide incorporé. Le pyrophosphate est ensuite converti en ATP par une sulfurylase. Puis, il y a la luciférase qui va utiliser l'ATP comme substrat afin de générer un signal, lequel est détecté par un système de caméra sensible. L'émission ou l'absence de lumière après l'addition de chaque nucléotide est convertie en séquence d'ADN par un logiciel. Grâce à cette technique, 40 à 50 nucléotides par fragment peuvent être lus [269]. Une des dernières technologies émergentes et en pleine expansion consiste en l'analyse métagénomique [270]. Cette méthode consiste à étudier le contenu génétique d'un échantillon issu d'un environnement complexe (intestin, sols, eau, etc.) trouvé dans la nature, contrairement à des échantillons cultivés en laboratoire. Le but de cette technique, se faisant par un séquençage direct de l'ADN présent dans l'échantillon, est d'avoir une description de la composition structurale et fonctionnelle de l'échantillon. Un séquençage à haut débit est alors utilisé. Ce type de séquençage permet d'amplifier spécifiquement un fragment d'ADN isolé, par exemple, dans des microgouttes d'huile ou par fixation sur lame [270]. Ainsi, cette technique pourrait aider à mieux comprendre et gérer la dissémination et l'impact des gènes de résistance aux antibiotiques dans des environnements complexes tels que la flore gastrointestinale en évitant ainsi le passage par des méthodes de culture en laboratoire.

Les techniques moléculaires offrent la possibilité de déterminer les profils de résistance aux antibiotiques plus rapidement tant chez les microorganismes à croissance lente que ceux étant difficiles à faire croître *in vitro*. Cet avantage devient de plus en plus important avec l'augmentation de la résistance aux antibiotiques, laquelle

compromet les options disponibles pour le traitement des infections [259]. Les techniques moléculaires ont été décrites pour la détection de la résistance aux antibiotiques envers un grand nombre de déterminants de résistance et un large éventail d'espèces bactériennes. Malgré les possibilités offertes par les techniques moléculaires, leur utilisation est souvent limitée à la recherche scientifique et leur mise en place dans les tests diagnostiques de routine peut être problématique. Un certain nombre de raisons sont en cause : (i) le coût des tests moléculaires est considérablement plus élevé que celui des tests phénotypiques; (ii) le nombre de tests commerciaux disponibles est limité; (iii) la conception et la validation d'un nouvel essai nécessite une expertise technique et microbiologique considérable, spécialement lorsque le test moléculaire semble plus sensible que la méthode standard existante; et (iv) les organismes sont souvent multi-résistants et de nombreux gènes ou mutations ponctuelles sont impliqués [259]. Dans ce dernier cas, on a qu'à penser au développement de la multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* [271]. La multirésistance aux antibiotiques reflète souvent une combinaison de plusieurs mécanismes de résistance. Les pompes à efflux sont des composantes communes chez les isolats multirésistants de *P. aeruginosa*. Elles préviennent l'accumulation d'agents antibactériens dans la bactérie en expulsant l'antibiotique de la cellule avant qu'il n'ait l'opportunité d'atteindre la concentration adéquate au site d'action. Les pompes à efflux travaillent souvent en complémentarité avec la perméabilité limitée de la membrane externe de *P. aeruginosa* afin de produire de la résistance envers les bêta-lactamines, les fluoroquinolones, la tétracycline, le chloramphénicol, les macrolides, le triméthoprim et les aminoglycosides [272, 273]. Ainsi, ces multiples mécanismes de résistance aux antibiotiques sont un exemple de ce qui peut être difficile, voire impossible, à identifier par de simples tests phénotypiques.

2. Antibiotiques et antibiorésistance

2.1 Définition et antibiotiques utilisés en productions aviaire et porcine

Un antibiotique est une substance d'origine microbienne qui empêche la croissance d'autres microorganismes ou les détruit. Les antibiotiques altèrent donc le fonctionnement normal des bactéries en exerçant une action spécifique, c'est-à-dire qu'ils dérèglent le métabolisme de certains microorganismes sans affecter les cellules

humaines ou animales. Dans la nature, les antibiotiques offrent un avantage aux bactéries et aux moisissures qui les synthétisent en leur permettant de conserver leur niche écologique. Cet atout leur permet de mieux acquérir les substances nutritives disponibles dans leur environnement face à leurs compétiteurs et de croître ainsi plus facilement [269]. On les utilise fréquemment pour le traitement et la prévention des maladies chez l'humain et les animaux, mais également en tant que promoteur de croissance dans l'industrie des animaux de consommation [254].

Les antibiotiques peuvent être naturels, semi-synthétiques ou synthétiques. Les antibiotiques naturels sont des composés chimiques produits par de multiples espèces de microorganismes dont les fungus et les bactéries. Ils permettent d'inhiber la croissance bactérienne ou de tuer les bactéries. Les antibiotiques de cette catégorie sont les pénicillines G et V, la streptomycine, le chloramphénicol, les tétracyclines et les macrolides. Les antibiotiques semi-synthétiques sont produits à partir des antibiotiques naturels. Ceux-ci subissent une modification dans leur structure chimique en laboratoire. Par exemple, la méthicilline, modifiée à la position 6 de la chaîne latérale, est un dérivé de la pénicilline. Les antibiotiques synthétiques sont complètement fabriqués en laboratoire. Les sulfamides, les nitrofuranes et les quinolones sont des exemples d'antibiotiques synthétiques [274].

Les antibiotiques diffusent généralement à travers la paroi bactérienne pour ensuite diffuser à travers l'espace intra-bactérien et finalement se fixent sur leur cible. Ils peuvent être bactériostatiques ou bactéricides [269].

Les antibiotiques agissent également sur différents groupes de bactéries et selon la proportion de ces groupes nous pouvons déterminer si l'antibiotique a un spectre d'action étroit, moyen ou large [275]. Ainsi, suivant cet ordre, plus le spectre est grand, plus l'antibiotique affectera de nombreux groupes bactériens. Le problème de l'utilisation des antibiotiques à large spectre est qu'ils affectent également les flores commensales bactériennes du tractus respiratoire, cutané et intestinal permettant ainsi aux microorganismes résistants de demeurer dans la niche écologique [275].

Les interactions qui se produisent entre les différents antibiotiques et les bactéries se nomment mécanismes d'action des antibiotiques. Ceux-ci peuvent se diviser en cinq

classes : inhibition de la biosynthèse de la paroi bactérienne, inhibition de la synthèse ou du fonctionnement de la membrane plasmique, inhibition des fonctions de l'acide nucléique (transcription et réplication), inhibition des analogues métaboliques de l'acide nucléique, et inhibition de la synthèse protéique par interférence au niveau des ribosomes [269]. Les antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire et leurs différents mécanismes d'actions se retrouvent au tableau VI.

Tableau VI. Les antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire et leur mécanisme d'action [254, 269, 276].

Mécanismes d'action	Mécanismes d'action spécifiques	Antibiotiques ou classe d'antibiotiques
Membrane cellulaire	Modification mouvement ions monovalents (Na^+ , K^+) et divalent (Ca^{2+}) à travers la membrane	Ionophores ^a
	Interaction avec les phospholipides de la membrane augmentant ainsi la perméabilité	Polypeptides ^b
Synthèse ADN	Formation d'un complexe stable avec ARN pol ADN-dépendante	Rifampicine
	Liaison avec ADN gyrase	Quinolones
Synthèse de la paroi	Liaison aux précurseurs D-Ala-D-Ala du peptidoglycan	Glycopeptides
	Inhibition des enzymes transpeptidases et PBP nécessaires à la synthèse du peptidoglycan	Pénicillines
	Inhibe déphosphorylation d'un lipide pyrophosphate	Bacitracine
	Liaison avec PBP empêchant la synthèse du peptidoglycan	Céphalosporines
Synthèse protéique	Fixation à la sous-unité 30S du ribosome	Aminoglycosides
	Fixation à la sous-unité 50S du ribosome	Macrolides, Lincosamides, Pleuromutilines
	Fixation irréversible des sous-unités 50S et 70S du ribosome	Streptogramines
	Transport actif à travers membrane et liaison à la sous-unité 30S du ribosome	Tétracyclines
	Fixation à la sous-unité 50S du ribosome et empêche transpeptidation	Phénicoles
Substitution par analogues métaboliques et synthèse anormale du PABA	Interférence avec production acide folique par inhibition de l'enzyme dihydrofolate réductase	Triméthoprim
	Interférence avec synthèse acide folique par compétition avec le PABA en utilisant l'enzyme dihydroptéroate synthétase	Sulfamides

Exemples d'antibiotiques : (a) salinomycine; (b) polymyxine B.

Les antibiotiques sont utilisés en production aviaire et porcine soit de manière thérapeutique, préventive ou afin de stimuler la croissance et ainsi augmenter les

performances zootechniques. En usage thérapeutique, l'antibiotique peut être administré à un seul individu, mais la plupart du temps le lot entier est traité afin d'éviter la propagation de l'infection. En usage préventif, les animaux sont exposés aux antibiotiques durant les périodes à risque plus élevé de maladie telles qu'après le sevrage ou le transport des animaux. L'usage le plus controversé des antibiotiques, tant au niveau de la population que la communauté scientifique, est celui des promoteurs de croissance. La raison de cette controverse consiste en leur utilisation à de faibles concentrations sur une période de temps plus élevé, et cela principalement pour obtenir un meilleur rendement de production et une meilleure conversion des aliments chez l'animal. Les promoteurs de croissance ont été préconisés dans le milieu des années 50, lorsqu'il a été découvert que de petites quantités sous-thérapeutiques d'antibiotiques, tels que la pénicilline procainique et la tétracycline (1/10 à 1/100 de la dose thérapeutique), délivrées aux animaux par l'alimentation, pouvaient augmenter le ratio aliments/poids de la volaille, du porc et des bovins [277]. Pendant plusieurs années, les effets positifs de cette pratique ont été défendus tandis que les effets négatifs n'étaient pas encore détectés. Voici dans le tableau ci-dessous, les différents types d'utilisation des antibiotiques.

Tableau VII. Types d'utilisations des antibiotiques en production aviaire et porcine (tableau modifié de [278]).

Utilisation	But	Voie d'administration	Groupes d'animaux visés
Thérapeutique*	Traiter une infection en cours	Ingestion (aliments et eau) ou injection	Animaux malades ou tous les animaux
Prophylactique*	Prévenir une infection chez un lot d'animaux	Habituellement par ingestion (aliments ou eau)	Groupes spécifiques (ex. : porcelets en post-sevrage) ou statut sanitaire particulier (ex.: traitement préventif de l'entérite nécrotique dans élevages poulets)
Facteur de croissance	Favoriser le gain de masse de l'animal.	Habituellement par les aliments	Tous les animaux d'un groupe d'âge, d'un lot ou d'un troupeau donné

* Une utilisation combinant un usage thérapeutique et prophylactique est appelée « métaphylactique ».

Selon les différents usages, voici maintenant un tableau résumant les antibiotiques étant homologués au Canada chez la volaille, le porc, les animaux de compagnie et l'homme

(Tableau VIII). Pour ce dernier, les antibiotiques énumérés ne sont pas nécessairement directement utilisés, mais un autre antibiotique faisant partie de la même classe peut l'être.

Tableau VIII. Antibiotiques homologués au Canada chez la volaille, le porc, les animaux de compagnie et les humains [255, 279].

Classes antibiotiques	Antibiotiques	Volaille (○) Porc (●)		Animaux de compagnie	Humains
		Thérapie / Prophylaxie	Promoteur de croissance	Thérapie	Thérapie
Aminoglycosides	Gentamicine, Néomycine, Spectinomycine, Streptomycine	● ○		X	X
Bêta-lactamines (Pénicillines)	Amoxicilline, Ampicilline, Ampicilline/Sulbactame, Pénicillines	● ○		X	X
	Pénicilline G	○	○	X	X
Céphalosporines	Ceftiofur ^a	● ○		X	X
Glycophospholipides	Flavomycine		○		
Ionophores	Salinomycine	●	●		
Lincosamides	Lincomycine/Spectinomycine	● ○		X	
	Lincomycine	● ○			X ^b
	Clindamycine			X	X
Macrolides	Érythromycine	○	○		X
	Tilmicosine	●			
	Tulathromycine	●			
	Tylosine	● ○	● ○		X
Nitrofuranes	Nitrofurantoïne			X	X

Les classes d'antibiotiques en gras représentent ceux les plus utilisés en production animale, en kilogramme, au Canada.

^a N'était plus utilisé depuis quelques années suite à un arrête volontaire, mais l'usage a repris depuis 2008 sur une base de rotation de produits au couvoir.

^b Son utilisation chez l'homme est plutôt rare.

Tableau VIII (Suite).

Classes antibiotiques	Antibiotiques	Volaille (○) Porc (●)		Animaux de compagnie	Humains
		Thérapie / Prophylaxie	Promoteur de croissance	Thérapie	Thérapie
Phénicoles	Florfénicole	● ○			
	Chloramphénicol			X	X
Pleuromutilines	Tiamuline	●			
Polypeptides	Bacitracine		● ○		X
Quinolones	Enrofloxacin	●		X	X
	Marbofloxacin			X	
	Orbifloxacin			X	
	Difloxacin			X	
Streptogramines	Virginiamycine		● ○		X
Sulfamides	Sulfaméthazine	● ○			X
	Sulfaquinoxaline	○			
	Sulfadiméthoxine			X	
	Triméthoprime/Sulfa	● ○			X
Tétracelines	Tétracycline, chlortétracycline, oxytétracycline	● ○	● ○		X

Les classes d'antibiotiques en gras représentent ceux les plus utilisés en production animale, en kilogramme, au Canada.

2.2 Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est la capacité d'un microorganisme de résister aux effets des antibiotiques. Elle se développe via la sélection naturelle par des mutations aléatoires ou des échanges de gènes de résistance (transfert horizontal) entre les bactéries. Ainsi, la résistance aux antibiotiques est la conséquence de l'évolution. L'action des antibiotiques exerce une pression sélective dans l'environnement. Les bactéries qui présentent une mutation leur permettant de survivre, continuent de se reproduire en présence ou non de l'antibiotique. Ainsi, elles transmettent à leur descendance leur gène de résistance et donnent une génération de bactéries pleinement résistantes.

Il est connu depuis un certain temps que les souches bactériennes résistantes aux antibiotiques peuvent être isolées en ensemençant simplement des bactéries provenant

de l'environnement sur des milieux sélectifs en laboratoire [280]. Ce n'est pas surprenant pour le groupe des actinomycètes produisant des antibiotiques, puisqu'il possède des gènes codant pour de la résistance aux composés qu'ils produisent. Dans plusieurs cas, les mécanismes de résistance ont été identifiés et sembleraient être des modifications enzymatiques spécifiques des antibiotiques. Les streptomycètes ont longtemps été connus comme produisant une variété de bêta-lactamases qui pourraient très bien être la source de quelques formes cliniques de la résistance aux bêta-lactamines [281, 282]. Plusieurs mécanismes de résistance, tels que ceux retrouvés chez le producteur de tétracycline *Streptomyces rimosus* [283], sont communs chez les bactéries productrices de molécules de résistance. Basées sur les similarités biochimiques et génétiques, de tels mécanismes de résistance ont présagé ceux ayant été retrouvés par la suite chez les pathogènes résistants aux antibiotiques [284]. Dans une approche voulant quantifier la densité de gènes de résistance/phénotype dans l'environnement, Wright et al. [285] ont analysé une collection d'actinomycètes morphologiquement distincts (incluant plusieurs souches produisant des antibiotiques) pour déterminer leur résistance envers 21 différents antibiotiques. Un nombre significatif de souches étaient résistantes à une moyenne de 7 à 8 antibiotiques; ils étaient donc naturellement multi-résistants. La population de gènes de résistance dans la nature se réfère comme étant le résistome environnemental [286]. De nouveaux mécanismes de résistance, aussi bien que plusieurs mécanismes reliés à ceux retrouvés chez les bactéries pathogènes, ont été identifiés dans la collection d'actinomycètes. Ceci serait donc l'évidence de la présence d'un vaste réservoir environnemental de gènes ayant le potentiel d'être acquis et exprimés en tant que déterminants de résistance pour tout inhibiteur surutilisé. Cependant, d'autres études sont encore nécessaires pour établir une forte corrélation entre l'origine environnementale et clinique des gènes de résistance [287].

2.2.1 Résistance naturelle et acquise

La résistance peut être naturelle ou acquise [269]. La résistance naturelle s'exprime lorsqu'une souche « sauvage » résiste naturellement à certains antibiotiques. Par exemple, les bactéries à Gram-négatif sont résistantes aux glycopeptides, car ces derniers sont des molécules trop volumineuses pour passer à travers les porines de la

membrane externe. D'un autre côté, les bactéries à Gram-positif n'ont pas de membrane externe ce qui facilite l'accès à l'antibiotique [269]. La résistance naturelle se caractérise par sa présence chez toutes les souches d'une même espèce et est antérieure à l'usage des antibiotiques par l'homme. La résistance acquise, tant qu'à elle, est présente chez quelques souches d'une espèce sensible et apparaît après usage d'antibiotiques (pression sélective). Elle se définit donc comme étant une propriété nouvelle apparaissant chez les espèces bactériennes jusqu'alors sensibles aux antibiotiques [280]. Cette résistance est due à une adaptation des bactéries aux antibiotiques. La résistance acquise peut être de type chromosomique ou transférable par des éléments mobiles. Les mutations chromosomiques peuvent modifier les cibles des antibiotiques ou encore certaines structures cellulaires. Ces mutations sont des événements rares permettant des résistances stables pouvant se transmettre à la descendance [269]. Cette transmission se nomme verticale, car elle reste toujours au niveau de la même espèce, de la cellule mère à la cellule fille. La plupart du temps, une mutation va apporter la résistance pour un antibiotique ou des antibiotiques appartenant à la même famille, on parle alors de résistance croisée. Par contre, une mutation peut également entraîner la résistance à plusieurs antibiotiques par imperméabilité [269].

La résistance acquise peut être de type pénicillinique. Celle-ci représente une acquisition complète de la résistance par la succession de plusieurs mutations. Ainsi, l'acquisition se produit lentement. Il y a aussi la résistance streptomycinique qui, contrairement à la pénicillinique, est acquise complètement par une seule mutation [254]. Les antibiotiques ne sont pas directement mutagènes, mais ils sélectionnent les rares mutants spontanés résistants au sein d'une population bactérienne sensible [269].

La résistance acquise, transférable par des éléments mobiles, est liée à la présence de gènes transférables. Les éléments permettant le transfert de ces gènes sont principalement les plasmides, les transposons et les intégrons.

2.2.2 Résistance acquise

2.2.2.1 Conjugaison, transformation et transduction

La plupart des résistances acquises sont due à une acquisition d'éléments mobiles contenant des gènes de résistance. L'acquisition d'ADN contenant potentiellement des

gènes de résistance se fait par conjugaison, transformation ou transduction. Ces gènes sont à l'origine extra-chromosomiques, mais certains peuvent s'intégrer au chromosome bactérien après leur acquisition. Le transfert produit se nomme horizontal, car les gènes se déplacent entre des bactéries de même genre et espèce ou de genres et espèces différentes [254]. Cette résistance acquise par la bactérie réceptrice entraînera la synthèse de nouvelles protéines permettant la protection des bactéries par différents mécanismes [269].

La conjugaison consiste en un mécanisme sexuel de transfert de matériel génétique. Les caractéristiques importantes de la conjugaison se caractérisent par le contact des bactéries et par la polarité du transfert, c'est-à-dire toujours dans le sens d'une bactérie donatrice (mâle ou fertile) vers une bactérie réceptrice (femelle). C'est le caractère de fertilité qui est responsable du transfert. Ce caractère est porté par le plasmide nommé plasmide sexuel (plasmide F). Les bactéries appartenant à des espèces, des genres ou même des familles différentes peuvent effectuer un transfert entre elles ainsi qu'entre des bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif [288]. Il est à noter que la conjugaison est le principal mécanisme de transfert des gènes de résistance chez *Enterococcus* spp. [289].

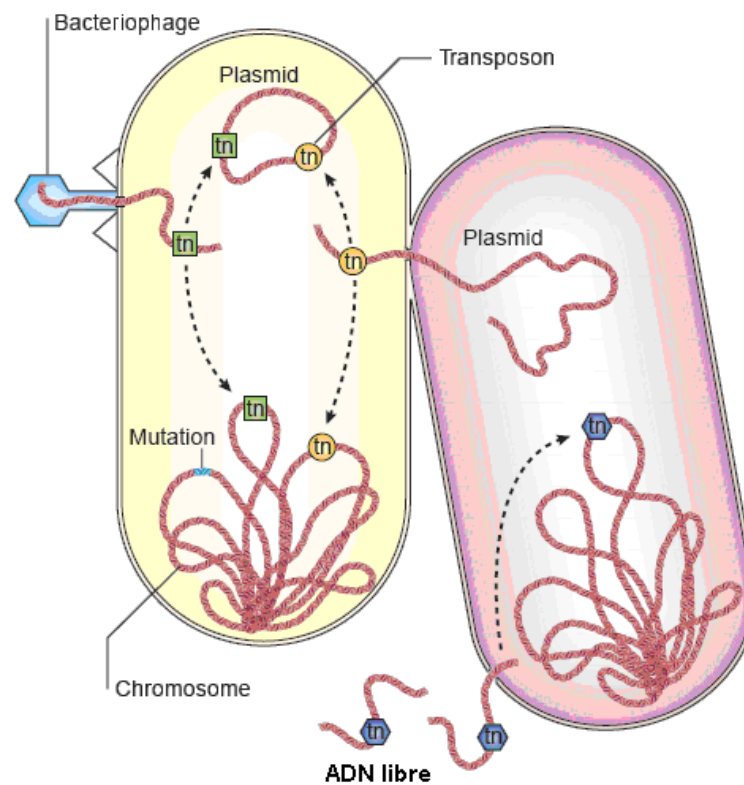
Le transfert des gènes de résistance peut se faire également par transformation ou par transduction. La transformation est l'incorporation d'ADN nu du milieu externe. C'est une acquisition permanente pouvant entraîner une modification héréditaire de la bactérie réceptrice. La bactérie réceptrice doit être compétente, c'est-à-dire qu'elle doit produire des protéines particulières permettant la pénétration de l'ADN étranger. Il est possible expérimentalement de rendre une bactérie compétente en utilisant entre autres du CaCl_2 qui rend la membrane cellulaire perméable à l'ADN [288]. Si l'ADN étranger est sous forme d'un plasmide, ce dernier, une fois incorporé, demeurera extra-chromosomique et se répliquera de manière autonome. La transduction se fait à l'aide d'un bactériophage qui consiste en un virus parasitant les bactéries. Ils possèdent un génome composé d'ADN mono- ou bicaténaire, ou d'ARN. Ce génome est protégé par une capside protéinique.

La transduction se traduit par le cycle lytique du bactériophage qui comprend les étapes d'adsorption, d'injection, de synthèse et de lyse bactérienne. Ainsi, le virus

rencontre la bactérie spécifique, injecte son génome pour que ce dernier puisse exprimer les protéines nécessaires à sa multiplication et finalement, la bactérie est lysée pour libérer toutes les particules infectieuses nouvellement produites. Lors de ce cycle, il est possible que des segments d'ADN contenant des gènes de résistance n'aient pas été incorporés dans les virus et soient libres. Cet ADN libre peut être par la suite incorporé par d'autres bactéries, et ces dernières, acquièrent donc la résistance codée par ce ou ces gènes [288].

La figure 6 illustre les différents mécanismes d'acquisition et de dissémination de la résistance par une bactérie.

Figure 6. Mécanismes génétiques de dissémination de la résistance aux antibiotiques (adapté de [290]).



2.2.2.2 Conjugaison répondant aux phéromones

La première étape de cette conjugaison consiste en la formation d'agrégats de bactéries. Ceux-ci vont faciliter le transfert de l'ADN plasmidique d'une cellule donatrice vers une cellule réceptrice grâce à la formation d'un complexe unique de multi-protéines formé dans la région du contact bactérien. Les fonctions de conjugaison sont codées par la région *tra* du plasmide, laquelle, chez les bactéries à Gram-positif, démontre une homologie avec les gènes codant pour le système de sécrétion de type IV. Plusieurs composantes codées dans cette région sont responsables de la liaison de l'ADN plasmidique, de la translocation ATP-dépendante de l'ADN simple brin ou de la formation du canal de conjugaison [291].

Les plasmides répondant aux phéromones des entérocoques, constituent un des mécanismes de transfert horizontal d'éléments génétiques mobiles les plus originaux décrits chez les bactéries. Le mécanisme de conjugaison de ces plasmides, découvert il y a plus de 30 ans [292], est basé sur l'existence de molécules spéciales nommées phéromones. Ces dernières sont de petits peptides extracellulaires spécifiques envers les bactéries donatrices possédant divers plasmides conjugatifs répondant aux phéromones. Les phéromones sont produites par des bactéries réceptrices potentielles, c'est-à-dire des bactéries qui n'ont pas de plasmide appartenant à un groupe de phéromones particulier. Ces signaux moléculaires sont codés sur le chromosome, tandis que les déterminants génétiques, pour la détection du signal et la réponse s'en suivant, sont codés sur le plasmide répondant aux phéromones [156]. La cellule donatrice, en présence de la phéromone, exprime des structures protéiques [293] à sa surface nommées SA. Cette dernière se lie à une substance de liaison (BS) présente à la surface de la bactérie réceptrice. Durant ce processus, un canal de conjugaison entre le donneur et le receveur est formé, lequel permet le transfert de l'ADN plasmidique. Après l'acquisition du plasmide, la bactérie réceptrice arrête la production de la phéromone et commence à produire un peptide inhibiteur spécifique codé sur le plasmide. Ce peptide permet de désensibiliser la bactérie à de faibles niveaux de phéromone endogène et de celles exogènes produites par les donneurs [294]. De plus, des protéines d'exclusion de surface sont exposées à la surface de la bactérie afin de prévenir l'acquisition des plasmides déjà

présents dans la cellule (mécanisme d'entrée-exclusion). Bien qu'encore mal défini, leur rôle probable serait de bloquer le transfert de l'ADN plasmidique en perturbant la formation d'agrégats conjugatifs entre les donneurs [295]. L'acquisition du plasmide répondant aux phéromones par une bactérie réceptrice rend celle-ci donneuse potentielle, car tous les éléments nécessaires à la réponse aux phéromones et au transfert conjugatif sont codés par le plasmide nouvellement acquis.

Le système de conjugaison répondant aux phéromones a été plus spécifiquement étudié pour les plasmides pAD1, pCF10, pPD1 et pAM373 chez *E. faecalis*. Le tableau IX représente les étapes de conjugaison de ces plasmides et les déterminants moléculaires clés de chaque système.

Tableau IX. Étapes de la conjugaison des quatre plasmides répondant aux phéromones les mieux caractérisés et déterminants moléculaires clés des fonctions de conjugaison (selon [296]).

Étapes de conjugaison	Nomenclature des protéines et des gènes impliqués dans les étapes de conjugaison des différents plasmides			
	pAD1	pCF10	pPD1	pAM373
1. Sécrétion des phéromones codées par le chromosome	cAD1 (<i>cad</i>)	cCF10 (<i>ccfA</i>)	cPD1 (<i>cpd</i>)	cAM373 (<i>camE</i>)
2. Reconnaissance et internalisation des phéromones à la surface des cellules réceptrices	TraC	PrgZ	TraC	TraC
3. Induction du système de conjugaison	TraA	PrgX	TraA	TraA
4a. Synthèse de la substance d'agrégation (SA) sur la surface de la cellule donatrice	Asa1 (<i>asa1</i>)	Asc10 (<i>prgB</i>)	Asp (<i>asp</i>)	Asa373 (<i>asa373</i>)
4b. Agrégation des donneurs et receveurs – liaison entre AS et BS (substance de liaison sur cellules réceptrices)	Sea1 (<i>sea1</i>)	PrgA (<i>sec10</i>)	Sep1 (<i>sep1</i>)	Aucun
5. Initiation du transfert plasmidique	<i>oriT1</i> , <i>oriT2</i> , TraX, TraW	<i>oriT</i> , PcfG	<i>nk</i>	<i>oriT</i> , homologues TraX et TraW
6. Arrêt des fonctions de conjugaison dans la cellule réceptrice ayant reçu le plasmide	iAD1 (<i>iad1</i>)	iCF10 (<i>prgQ</i>)	iPD1 (<i>ipd</i>)	iAM373 (<i>iam373</i>)

* Il est à noter à l'étape 4b que les protéines impliquées décrites sont les protéines d'exclusion de surface. Elles sont inscrites à cette étape car elles seraient impliquées dans la perturbation de la formation d'agrégats suite à l'acquisition du plasmide.

Le plasmide hautement conjugatif pAD1 (60 kb) a été un des premiers plasmides répondant aux phéromones caractérisé chez l'isolat clinique *E. faecalis* DS16. Il porte

plusieurs déterminants de résistance et de virulence [297]. Plus de la moitié des gènes de pAD1 sont consacrés à la réponse de conjugaison et à sa régulation [298]. Ces régions démontrent un haut niveau d'homologie aux régions équivalentes des autres plasmides répondant aux phéromones [299]. Toutes les étapes majeures, résultant en l'acquisition de pAD1 par les bactéries sans plasmide, sont très similaires chez la plupart des plasmides répondant aux phéromones caractérisés à ce jour. Une exception, le plasmide pAM373, démontre des différences au niveau du contenu génétique et de leur fonction. La SA codée sur le plasmide est structurellement différente et est capable de se lier aux bactéries sans BS [300]. Une autre caractéristique de pAM373 est l'absence du mécanisme entrée-exclusion [301]. Ainsi, on ne connaît pas le mécanisme permettant d'éviter l'acquisition de plasmides déjà présents dans la bactérie.

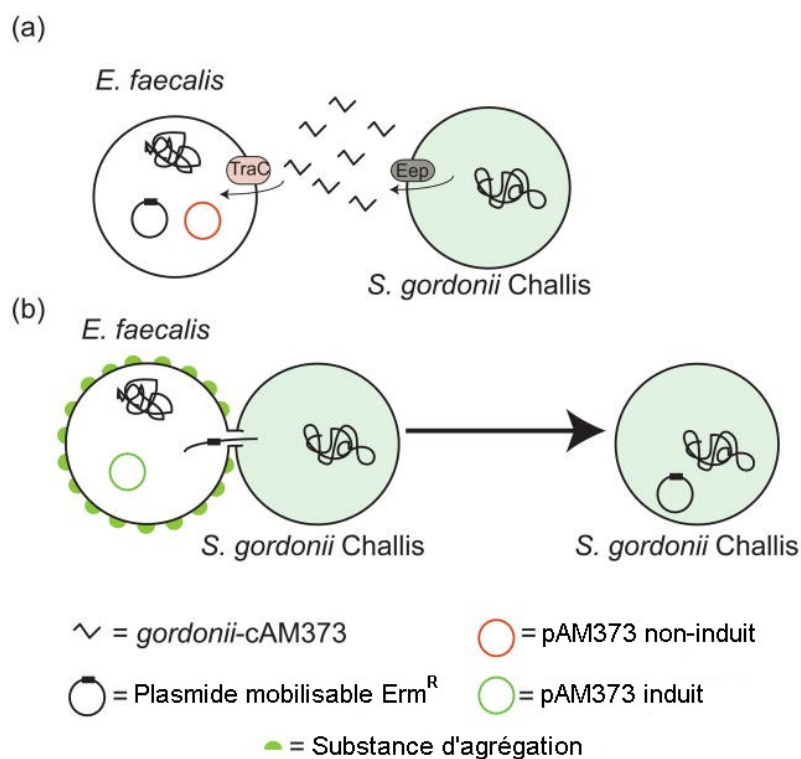
La première évidence de l'existence d'une molécule induisant l'agrégation cellulaire et la conjugaison a été démontrée par Dunny et al. [292]. Travaillant sur *E. faecalis*, ils ont découvert des facteurs, sensibles à la protéase et stable à la chaleur, qu'ils ont nommé phéromones. Plusieurs phéromones produites par les souches sans plasmide, démontrent une haute spécificité aux plasmides répondant aux phéromones correspondants. Une seule bactérie peut produire un minimum de six phéromones différentes [302]. Cette production résulte en la conjugaison et l'acquisition d'un plasmide dont l'arrêt de la sécrétion de la phéromone correspondante s'en suit. Malgré tout, la synthèse des autres phéromones continue et donc, une seule bactérie est capable d'accumuler différents plasmides répondant aux phéromones [161]. Ces plasmides peuvent être divisés en sous-groupes selon leur sensibilité aux phéromones, laquelle peut être comparée aux caractéristiques d'incompatibilité des plasmides [299]. Dans le but de clarifier le rôle des phéromones dans l'environnement intestinal, une étude a comparé des souches d'*E. faecalis* croissant dans le mucus intestinal isolé de rats exempts de germes (*ex vivo*) versus celles en bouillon de culture (*in vitro*) afin d'évaluer l'effet de phéromones synthétiques cCF10 sur la cinétique de transfert du plasmide répondant aux phéromones pCF10 [303]. Ils ont pu observer qu'effectivement les phéromones joueraient un rôle dans le transfert plasmidique dans l'environnement intestinal. La même équipe aurait également démontré que le plasmide pCF10 pouvait être efficacement transféré *in vivo* entre des souches d'*E. faecalis* colonisant l'intestin de

mini-cochons [304]. Selon les résultats obtenus dans le mucus de rats, les auteurs émettent l'hypothèse que pour obtenir un transfert efficace dans l'intestin, les cellules d'*E. faecalis* produisant les phéromones cCF10 doivent soit être en abondance dans l'environnement intestinal, ou avoir été présentes suffisamment longtemps afin qu'il y ait eu accumulation de cCF10 dans la couche muqueuse de l'intestin [303].

Les déterminants génétiques codant pour les phéromones ont été identifiés par Clewell et ses collaborateurs en 2000 [305]. L'étude a révélé que les phéromones font parties de la séquence signal de précurseurs lipoprotéiques. Dans le cas de cAD1, le peptide mature correspond aux huit derniers résidus des 22 acides aminés de la séquence signal du précurseur lipoprotéique [306]. La maturation de la molécule implique l'action d'une lipoprotéine signal peptidase et de la protéine Eep, similaire à certaines métalloprotéases [307]. L'identification des précurseurs du peptide inhibiteur de la phéromone, codés par les plasmides, a été faite beaucoup plus tôt. Par exemple, l'inhibiteur de pAD1, iAD1, est codé par le gène *iad*. Le peptide inhibiteur iAD1 est de la même taille et possède une séquence similaire à la phéromone. Il correspond également aux 8 derniers résidus des 22 acides aminés du précurseur [308]. La majorité des autres phéromones connues et des inhibiteurs de phéromones, démontrent une similarité dans leur mécanisme de transformation et leur structure finale [305], à l'exception de cAM373, lequel est produit indépendamment de l'activité de la protéine Eep [309]. La phéromone du plasmide pAM373 représente le seul exemple où un peptide similaire est excrété par une bactérie autre qu'un entérocoque, tel qu'un staphylocoque ou un streptocoque [32, 310]. Par contre, il n'y aurait pas de relation entre les précurseurs lipoprotéiques de cAM373 et cAM373 de *S. aureus* (*camE*), suggérant que la similarité entre ces deux peptides n'est seulement qu'une coïncidence [311]. Les plasmides répondant aux phéromones ne semblent pas se répliquer ou s'établir efficacement dans des hôtes autres que les entérocoques. Par contre, une phéromone similaire à cAM373, produite par *Streptococcus gordonii* Challis, a facilité la mobilisation d'un plasmide co-résident de pAM373, soit un plasmide non-conjugatif codant pour de la résistance à l'érythromycine, de la souche donatrice *E. faecalis* vers la souche réceptrice *S. gordonii* Challis. De plus, ce transfert a été 1000 fois plus élevé

lorsque la bactérie donatrice *E. faecalis* était exposée à la phéromone similaire à cAM373 de *S. gordonii* (Figure 7) [32]. La production de la phéromone était dépendante d'un homologue Eep chez cet hôte, suggérant ainsi dans ce cas, un rôle de Eep dans la maturation de la phéromone.

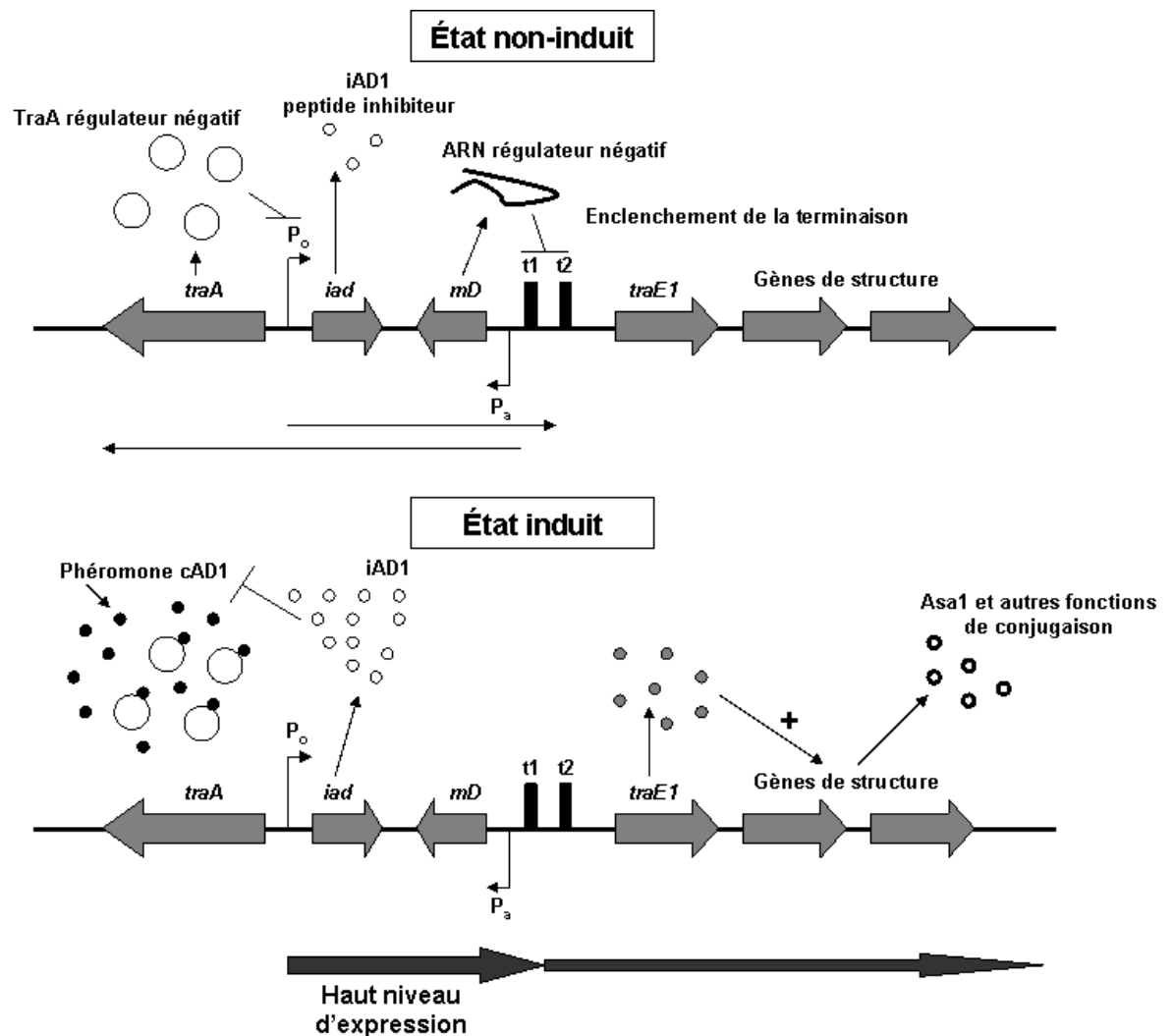
Figure 7. Modèle de la mobilisation de la résistance aux antibiotiques de la souche donatrice *E. faecalis* vers la souche réceptrice *S. gordonii* Challis en réponse à la phéromone *gordonii*-cAM373. (a) *S. gordonii* Challis produit un signal, *gordonii*-cAM373, qui est détecté par *E. faecalis* possédant le plasmide pAM373 via la protéine membranaire TraC; (b) Les fonctions de conjugaison sont induites sur pAM373 par la présence de *gordonii*-cAM373, ce qui mène à la formation du pore conjugatif et la mobilisation du plasmide non-conjugatif ayant la résistance à l'érythromycine. En l'absence de pAM373, il n'y a pas de transfert (non-montré).



Les bactéries réceptrices potentielles produisent de façon constitutive un haut niveau de phéromones. Par contre, un bas niveau de phéromones endogènes est également observé chez les donneurs. Une régulation stricte et complexe des fonctions

de conjugaison prévient l'auto-induction des plasmides répondant aux phéromones. Jusqu'à maintenant, ces mécanismes de régulation ont été étudiés principalement pour quatre plasmides, pAD1, pCF10, pPD1 et pAM373 [302]. Les joueurs clés de chacun de ces systèmes sont : (i) deux régulateurs intracellulaires négatifs essentiels qui contrôlent l'expression de gènes à partir de deux promoteurs opposés, et (ii) un régulateur positif qui contrôle la synthèse des gènes de structure de la conjugaison.

Figure 8. Représentation schématique du mécanisme de régulation de la réponse à la phéromone de pAD1 (adapté de [296]).



Légende : État non-induit : En l'absence de la phéromone cAD1, deux régulateurs négatifs, TraA et mD, vont garder le niveau d'expression du gène *iad* très bas et bloquer la transcription de *traE1* et des gènes de structure nécessaires à la conjugaison. **État induit :** Lorsque la phéromone entre dans la bactérie, elle se lie à TraA et la régulation négative est arrêtée. Ceci permet une synthèse à haut niveau de iAD1 (inhibiteur) et l'expression de TraE1 et des protéines de la machinerie de la conjugaison. *traE1*, gène régulateur positif – t1, t2, sites de terminaison – P_o, P_a, promoteurs opposés.

En l'absence d'un niveau d'induction de la phéromone (Figure 8, état non-induit), une protéine de régulation négative, TraA, bloque P_o, le promoteur du gène *iad*. Cette régulation a pour résultat l'expression du peptide inhibiteur à un très bas niveau permettant ainsi de titrer la phéromone endogène dans l'état non-induit [312]. La transcription à partir de P_o va jusqu'aux sites de terminaison t1 et t2, mais pas au-delà [313]. C'est la présence d'un second régulateur négatif, l'ARN antisens mD, exprimé à un niveau relativement élevé depuis le promoteur convergent P_a, qui permet de bloquer la suite de la transcription. L'expression à partir de ce promoteur donne également un bas niveau de la protéine TraA, essentielle pour l'inhibition de l'activité du promoteur P_o [302]. De plus, mD permet la terminaison de la transcription à t1 due à sa région de 11 nucléotides complémentaires à la région s'étendant jusqu'au transcrit en tête d'épingle du site de terminaison t1 [313]. Ce système de régulation négative complexe semble être une caractéristique importante de la régulation de la réponse aux phéromones en général [314].

Lorsqu'un niveau plus élevé de phéromones exogènes apparaît (Figure 8, état induit), ces dernières se lient à la surface de la bactérie donatrice et sont transportées dans le cytoplasme où elles se lient à TraA. Cette liaison permet d'arrêter la régulation négative en relâchant la protéine TraA du promoteur P_o [315]. Il en résulte une transcription plus élevée à partir de P_o amenant ainsi une production à haut niveau du peptide inhibiteur iAD1, mais également une transcription au-delà des sites de terminaison t1 et t2 et donc, l'expression du régulateur positif TraE1. Ce dernier permet par la suite l'expression des gènes de structure de la conjugaison tels que *asaI* codant pour la SA. Cette expression permettra à la bactérie réceptrice de former des agrégats

avec les donneurs et ainsi d'acquérir le plasmide. La présence d'un niveau élevé de iAD1 résulte en une terminaison rapide des fonctions de conjugaison. Ce mécanisme de régulation sophistiqué permet de répondre aux moindres petits changements en concentration de phéromones et de peptides inhibitoires assurant ainsi une sensibilité élevée face à la présence de bactéries réceptrices [156].

2.2.2.3 Persistance de la résistance acquise

La persistance ou la perte de la résistance aux antibiotiques acquise dépend de plusieurs processus biologiques. Les niveaux de résistance observés d'un pays à un autre sont cohérents avec les études empiriques et théoriques qui ont identifiées le volume d'antibiotiques utilisé comme grand responsable de la fréquence élevée de la résistance [316, 317]. Malgré les bases théoriques bien décrites sur les prédictions du développement de la résistance, quelques études épidémiologiques ont rapporté des changements temporels dans la fréquence de la résistance d'un antibiotique spécifique lorsque le volume de consommation de la communauté était délibérément réduit. Par exemple, Dagan et ses collaborateurs ont rapporté des variations saisonnières dans les profils de prescription en Israël : une consommation d'antibiotique plus élevée durant l'hiver était associée à des proportions plus élevées de *Streptococcus pneumoniae* résistants. Inversement, lorsque le taux de prescription chutait durant l'été, une réduction substantielle de la résistance était observée [318]. Par contre, de façon étonnante, dans une étude portant sur des isolats *Escherichia coli* résistants aux sulfamides au Royaume-Uni, une diminution de 98% des prescriptions de sulfonamides durant les années 1990 a été suivie par une augmentation de 6.2% des isolats résistants aux sulfamides [319]. De plus, une étude de suivi a démontré que cette résistance a persisté pendant cinq autres années [320]. Ils ont pu observer que le marqueur de résistance aux sulfamides, *sulIII*, était localisé à la base sur intégron qui lui était porté par de grands plasmides dont certains codaient pour de multiples résistances. De plus, il est connu que les intégrons codent fréquemment pour des résistances envers des composés tels que l'ammonium quaternaire. Le phénomène de colocalisation semble à la base de cette persistance.

Ces résultats opposés indiquent clairement que le sort des déterminants de résistance aux antibiotiques, suivant une réduction significative de la pression sélective,

dépend de facteurs autres que la consommation seule. Plusieurs processus réduisent l'inversion de la résistance acquise en l'absence d'une pression sélective. Ceux-ci incluent : le taux de ré-acquisition (facilité par le transfert horizontal des gènes et les mutations spontanées), les altérations par mutation permettant de réduire le coût d'énergie engendré par les déterminants de résistance acquise, la sélection directionnelle de traits génétiquement liés (phénomènes de colocalisation), et la présence de systèmes régulant la stabilité ségrégationnelle des éléments extra-chromosomiques portant des déterminants de résistance [321]. Ces processus peuvent agir seuls ou en concert afin d'élargir leur dissémination dans la population bactérienne, et permettent de déterminer si les phénotypes de résistance doivent être remplacés par des phénotypes de susceptibilité dans un intervalle de temps déterminé.

La co-résistance se produit lorsque des gènes codant pour des phénotypes de résistance sont localisés ensemble sur un même élément génétique tel qu'un plasmide, un transposon ou un intégron. Le lien physique résulte en la co-sélection pour d'autres gènes localisés sur le même élément [322]. Il est connu depuis plusieurs décennies que les gènes de résistance aux antibiotiques et aux métaux sont liés, particulièrement sur les plasmides [323, 324]. En plus de démontrer une corrélation entre la résistance au cuivre et la résistance aux macrolides et aux glycopeptides chez des *E. faecium* isolés de porcs ayant été exposés au cuivre, Hasman et Aarestrup [325, 326] ont observé le co-transfert de ces phénotypes de résistance dans une souche transconjugante *E. faecium*. Les déterminants génétiques de résistance peuvent être retrouvés également sur des éléments génétiques de plus grande taille (exemple : intégrons se retrouvant dans des transposons) de sorte que le transfert du plus grand élément génère également le transfert des éléments intégrés. Un cas de co-résistance bien documenté implique les transposons Tn21 et Tn21-like, qui ont été retrouvés chez les bactéries à Gram-négatif dont une souche *E. coli* aviaire. On peut retrouver, sur ces transposons, un opéron de résistance au mercure et un intégron contenant de multiples gènes de résistance aux antibiotiques [327-329]. Les transposons ont clairement un rôle dans la co-résistance par un mécanisme de co-sélection de la résistance aux antibiotiques et aux métaux. L'étendue de ce rôle est observée par l'abondance de transposons chez les bactéries pathogènes et de l'environnement. De plus, plusieurs études ont documenté la présence des transposons

Tn2I et Tn2I-like tant chez les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif pathogènes que non pathogènes [327, 328, 330]. Ainsi, ces éléments nous démontrent la problématique que représente la résistance aux antibiotiques et les difficultés auxquelles nous devons faire face pour la combattre.

2.2.3 Éléments génétiques mobiles

La capacité des entérocoques, spécialement *E. faecalis* et *E. faecium*, d'acquérir des éléments génétiques mobiles, codant entre autres pour de la résistance aux antibiotiques, a contribué à leur émergence en tant que pathogène important dans les hôpitaux. Les gènes de résistance aux antibiotiques et de virulence se sont accumulés dans les lignées associées aux épidémies d'infections nosocomiales [32]. *E. faecalis* V583 possède environ 620 kilobases de nouvelles séquences potentiellement codantes comparativement au plus petit génome de l'isolat non-clinique *E. faecalis* OG1RF. Ces séquences sont majoritairement dues à la présence d'éléments génétiques mobiles [8, 77]. Ces derniers incluent les séquences d'insertion, les transposons, les intégrons, les bactériophages, les îlots génomiques (tels que les îlots de pathogénie), les plasmides et des combinaisons de ces éléments [331]. Ci-dessous sont décrits les principaux éléments retrouvés chez les entérocoques.

2.2.3.1 Plasmides

Par définition, les plasmides sont des éléments génétiques extra-chromosomiques se répliquant de façon semi-autonome. Les différences dans les mécanismes de réplication et les structures modulaires affectent profondément les propriétés du plasmide, telles que sa taille, son nombre de copie, sa dépendance à un hôte et sa distribution à travers ceux-ci [332]. Les éléments essentiels d'un plasmide incluent les gènes codant pour une auto-réplication, une succession stable et une habileté à se transférer. Le contenu accessoire d'un plasmide est intégré entre les modules de base fonctionnels et représente un énorme réservoir de variabilité génétique, souvent de fonctions inconnues, et qui est partagé dans les différents genres bactériens via le transfert horizontal des gènes.

Il y a en général plusieurs critères de classification des plasmides dont un pour les bactéries à Gram-positif consistant au mode de réplication. Il y en a deux types dans ce cas-ci, le « rolling-circle » et le « tête ». La réplication « rolling-circle » ou circulaire de l'ADN, a été identifiée à l'origine chez *S. aureus* et a ensuite été observée dans virtuellement toutes les espèces bactériennes à Gram-positif, mais également dans un certain nombre d'espèces à Gram-négatif. En un court résumé, cette réplication est initiée par l'introduction d'une coupure simple brin au niveau de l'origine double-brin par la protéine initiatrice codée sur le plasmide. En utilisant le brin non coupé comme matrice, la réplication de l'ADN s'effectue le long de la molécule d'ADN circulaire déplaçant le brin coupé simple brin. La synthèse continue d'ADN peut générer plusieurs copies simples brins de la molécule d'ADN originale arrangées en concatémère. Ensuite, ces molécules linéaires peuvent être converties en molécules doubles brins [333]. Pour ce qui est de la réplication tête, elle consiste en deux fourches de réplication se déplaçant à partir de l'origine jusqu'à ce qu'elles aient copié tout le réplicon, c'est-à-dire dans ce cas-ci, le plasmide. Lorsque les fourches se déplacent autour du cercle, on obtient une structure qui a la forme de la lettre grecque tête (Θ). Ce type de réplication a été retrouvé chez des plasmides ayant un large éventail d'hôte de bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif [291].

Un autre critère de classification consiste en les plasmides ne pouvant pas co-résider dans une même cellule. Ils sont classés en différents groupes d'incompatibilité (Inc) [334, 335]. Les plasmides Inc18 constituent un grand groupe de plasmides retrouvés chez les entérocoques/streptocoques et pouvant se propager dans un large éventail d'hôtes dont différentes espèces bactériennes [336, 337]. Ensuite, il y a les plasmides répondant aux phéromones qui représentent un groupe unique de plasmides conjugatifs à hôtes spécifiques principalement décrits chez *E. faecalis* [338]. Récemment, Weaver et ses collaborateurs [339] ont proposé une nouvelle famille (RepA_N) de plasmides largement distribués chez les bactéries à Gram-positif, englobant les plasmides répondant aux phéromones d'*E. faecalis* et pRUM d'*E. faecium*. pRUM a permis d'identifier initialement le système de maintien toxine-antitoxine axe-txe et code pour de multiples résistances [340]. La comparaison détaillée des séquences de la protéine initiatrice de la réplication de cette famille suggère que les réplicons ont

évolué selon leur hôte spécifique, expliquant ainsi leur spécificité d'hôte relativement élevée.

Basé sur 111 séquences publiées des bactéries à Gram-positif, 19 familles de réplicons (famille *rep*) et plusieurs réplicons uniques ont été identifiés [341]. Utilisant un système de typage par PCR, les réplicons reliés à pCF10 (*rep*₉), Inc18 (*rep*₁ et *rep*₂) et pUSA02 (*rep*₇) ont été identifiés comme étant les plus communs dans les souches *E. faecalis* ($n = 28$), tandis que ceux de Inc18 (*rep*₂), pRII (*rep*₁₄) et pRUM (*rep*₁₇) dominaient chez *E. faecium* ($n = 51$) d'origines humaine et animale [341]. Ce système a également été utilisé par d'autres équipes. L'étude récente d'une collection diversifiée de souches *E. faecium* ($n = 93$), a révélé une prévalence élevée des réplicons reliés aux groupes de plasmides Inc18 (*rep*₂), pRUM (*rep*₁₇) et pHT β (*rep*_{unique}) [342]. Ce typage a permis de couvrir environ 60% du nombre total de plasmides visualisés par des analyses S1-nucléase. Les souches appartenant aux clones adaptés aux hôpitaux (reliés à CC17) ont démontré un nombre significativement plus élevé de types *rep* et de réplicons reliés à pRUM (*rep*₁₇), indiquant un rôle de l'ADN plasmidique accessoire dans l'adaptation à l'environnement hospitalier. Le même procédé a été fait pour une collection de souches *E. faecalis* et a permis de démontrer une dominance des plasmides répondant aux phéromones (*rep*₈ et *rep*₉), pS86 (*rep*₆) et Inc18 (*rep*₁ et *rep*₂).

Le fait de pouvoir déterminer un lien entre des déterminants de résistance et des types de réplicons spécifiques chez les entérocoques est important. Ce lien peut nous permettre de prédire les transferts potentiels vers d'autres genres bactériens grâce aux plasmides conjugatifs à large éventail d'hôtes. L'utilisation de l'électrophorèse à champs pulsé pour la migration de l'ADN des entérocoques digéré par l'enzyme S1 nucléase a démontré sa très grande efficacité dans l'identification et la détermination de la taille des plasmides de par leur apparence linéaire (5-400 kb) sur un faible fond d'ADN génomique [342-344]. Le lien physique entre les types *rep* et les déterminants de résistance peut être visualisé par co-hybridation sur l'ADN plasmidique linéarisé [342]. Par exemple, la co-hybridation et le séquençage plasmidique a permis de démontrer le lien entre l'opéron *vanA* et les plasmides Inc18, pHT β et pRUM chez *E. faecium* [342, 345-347].

L'analyse des plasmides génomiques des entérocoques est ralentie par le nombre comparativement élevé d'éléments extra-chromosomiques dans plusieurs souches. La taille énorme de plusieurs de ces plasmides et les multiples copies de séquences d'insertion (SI) localisées sur ces derniers a rendu l'analyse et l'assemblage des données brutes compliqués. Malgré tout, le séquençage de mégaplasmites de multirésistances (> 200 kb) est en progression, et révèle jusqu'à maintenant la présence de multiples déterminants de résistance liés à des protéines associées à la virulence [348]. Un exemple de ces mégaplasmites est le plasmide pLG1 (281 kb) qui a été isolé en Allemagne d'une souche clinique humaine *E. faecium*. Le séquençage du plasmide a révélé la présence du gène de virulence *hyl_{Efm}* (hyaluronidase), localisé sur un élément hautement similaire à un îlot génomique ayant déjà été décrit, et des gènes de résistance à la vancomycine et aux macrolides-lincosamides-streptogramines B (MLS_B) (*vanA* et *erm*(B), respectivement) [349].

2.2.3.1.1 Plasmides répondant aux phéromones

Le système de conjugaison permet une dissémination plasmidique efficace dans la population bactérienne. Il y a plusieurs autres modules fonctionnels présents sur les plasmides et essentiels pour leur stabilité dans la bactérie, tels que la réplication, la partition et les systèmes de stabilisation. En résumé, chaque plasmide contient au moins une séquence d'ADN qui sert d'origine de réplication. Celle-ci permet à l'ADN plasmidique d'être dupliqué de façon indépendante du chromosome bactérien. Ensuite, la partition des plasmides se définit comme étant le processus par lequel un plasmide nouvellement répliqué est distribué de façon appropriée à la cellule fille durant la division cellulaire. La stabilité d'un plasmide est influencée par le nombre de copies du plasmide dans la bactérie. Cette caractéristique permet le maintien de l'élément génétique dans la cellule durant la division cellulaire [350].

Les quatre plasmides répondant aux phéromones les plus étudiés, pCF10, pAD1, pAM373 et pPD1, ont servis pour les analyses de la machinerie de réplication. Les déterminants clés de ces plasmides sont *repA*, *repB* et *repC*. RepA joue un rôle en tant que protéine initiateur de la réplication et ressemble à une famille de protéines codées par plusieurs plasmides faibles en nombre de copies chez les bactéries à Gram-positif

démontrant une réplication de type tête [351]. Les protéines RepB et RepC représentent un système de partition [333]. Les plasmides répondant aux phéromones pAD1, pCF10, pAM373, pPD1, pTEF1 et pTEF2 font parties de la famille de réplicons RepA_N. Cette famille est distribuée dans plusieurs bactéries à Gram-positif faible en G+C autres que les entérocoques telles que les staphylocoques, les lactocoques, les streptocoques et autres, et même dans quelques phages [339]. Elle démontre une spécificité d'hôte élevée. Ceci indique que son évolution a pris place dans les hôtes natifs avec un nombre limité d'échanges génétiques entre les différents éléments de cette même famille. Les gènes codant pour les protéines initiatrices, nommés *oriV*, présentent des répétitions dans la région centrale et servent d'origine de réplication. Cette région *oriV*, de différents plasmides répondant aux phéromones, démontre une variabilité de séquence dans les répétitions. pCF10 et pPD1 sont des exemples intéressants de plasmides compatibles avec des séquences *oriV* se différenciant par un seul nucléotide. Ceci suggère un rôle de cette région en tant que déterminant d'incompatibilité et fournirait une bonne explication de la coexistence de plusieurs plasmides répondant aux phéromones dans une même bactérie.

Les déterminants *repB* et *repC*, adjacents au gène *repA*, sont requis pour une stabilisation maximale du réplicon [352]. Les séries de courtes répétitions, appelées itérons, entourent la région codante *repBC*. Leur séquence et leur arrangement varient selon les différents plasmides [333]. Le mécanisme d'action de RepBC est la formation de complexe RepC-itéron suivi d'une liaison de RepB ATPase, ce qui semblerait faciliter la connexion entre le complexe de partition et l'appareil de ségrégation de l'hôte, tel que suggéré dans d'autres systèmes de partition [353].

Un autre mécanisme, nommé système de dépendance ou toxine-antitoxine (STT), codé par plusieurs plasmides, prévient la perte du ou des plasmides par la population bactérienne. Deux types de STT peuvent être distingués selon leurs composantes. Le système dit « protéique » consiste en une toxine stable et une antitoxine instable. Tandis que le second type est dit « ARN », et consiste en une protéine jouant le rôle de toxine versus une molécule ARN, transcrite à partir du brin antisens de l'ADN, étant l'antitoxine. La traduction de la toxine à partir de l'ARNm est bloquée en présence de l'antitoxine ARN homologue par la formation d'un duplexe. Ce dernier est par la suite

dégradé par l'ARNase de la bactérie. Les bactéries n'ayant pas le plasmide sont tuées par la toxine traduite en l'absence de l'ARN antitoxine [350]. Parmi les STT des plasmides répondant aux phéromones, le locus *par* de pAD1 est le mieux caractérisé. Il représente un système de dépendance de type « ARN » inhabituel par lequel la liaison de deux ARNs mène à la formation d'un complexe très stable plutôt qu'à la dégradation de l'ARN [354]. La régulation du locus *par* est basée sur de petites régions homologues entre deux transcrits : ARNI (transcrit pour la toxine Fst) et ARNII (petit ARN antisens). Ils sont transcrits de façon convergente, et se chevauchent en 3' aux sites de terminaison de transcription bidirectionnelle et en 5', où des répétitions directes similaires sont présentes. Ces régions homologues résultent en la formation de complexes ARNI-ARNII stables et inhibent l'expression de Fst. L'ARNI, inhibé au niveau de la traduction, s'accumule dans la cellule. Lorsque le réplicon du plasmide est perdu, moins d'ARNII stable est dégradé et l'expression de la protéine Fst mène à la perméabilisation de la membrane et arrête la synthèse de macromolécules, causant ainsi la mort de la bactérie [355]. Les plasmides répondant aux phéromones décrits jusqu'à présent, sont présentés dans le tableau X.

Tableau X : Plasmides répondant aux phéromones retrouvés chez *E. faecalis* et *E. faecium* (adapté de [356] [296, 302]).

Plasmide	Hôte original	Taille (kb)	Résistances
pCF10	<i>E. faecalis</i> SF-7	65	Tc ^R
pBEM10	<i>E. faecalis</i> HH2	70	Bla ⁺ , Cm ^R , Km ^R , Tm ^R
pAM323	<i>E. faecalis</i> HH2	66	Em ^R
pHKK100	<i>E. faecium</i> 228	55	VanA
pHKK701	<i>E. faecium</i> R7	92	VanA
pBRG1	<i>E. faecium</i> LS10	50	VanA
pSL1,	<i>E. faecalis</i> KV1	128	VanA, Gm ^R , Km ^R ,
pSL2	<i>E. faecalis</i> KV2		Sm ^R , Em ^R
pAM368	<i>E. faecalis</i> 368	107	VanA
pMG2200	<i>E. faecalis</i> NKH15	106,5	VanB
pMG2201	<i>E. faecalis</i> NKH15	65,7	Em ^R
pTW9	<i>E. faecalis</i>	85	Bc ^R , VanA, MLS ^R
pAMS1	<i>E. faecalis</i> MC4	130	Cm ^R , Sm ^R , Tc ^R , Bac
Plasmide	Hôte original	Taille (kb)	Phénotypes
pAD1	<i>E. faecalis</i> DS16	60	Hly/Bac, UV ^R
pPD1	<i>E. faecalis</i> 39-5	56	Bac21 (AS-48)
pAM373	<i>E. faecalis</i> RC73	36	-----
pOB1	<i>E. faecalis</i> 5952	71	Hly/Bac
pJH2	<i>E. faecalis</i> JH1	59	Hly/Bac
pIP964	<i>E. faecalis</i>	65	Hly/Bac
pMB1	<i>E. faecalis</i> S-48	90	Bac (Bc-48)
pMB2	<i>E. faecalis</i> S-48	56	AS-48 (Bac21)
pYI1	<i>E. faecalis</i>	58	Hly/Bac
pYI2	<i>E. faecalis</i>	56	Hly/Bac
pYI14	<i>E. faecalis</i> YI714	61	Bac41
pYI17	<i>E. faecalis</i> YI717	58	Bac31
pAM γ 1	<i>E. faecalis</i> DS5	60	Hly/Bac, UV ^R
pAM γ 2	<i>E. faecalis</i> DS5	Ca. 60	Bac
pAM γ 3	<i>E. faecalis</i> DS5	Ca. 60	?
pAM324	<i>E. faecalis</i> HH2	53	?
pBEE99	<i>E. faecalis</i> E99	80,6	Bac, Bee, UV ^R

Abréviations : Bac, bactériocine; Bc, bacitracine; Bla, bêta-lactamase; Cm, chloramphénicol; Em, érythromycine; Gm, gentamicine; Hly, hémolysine; Km, kanamycine; MLS, macrolides-lincosamides-streptogramines; Tc, tétracycline; Tm, tobramycine; UV, ultra-violet.

2.2.3.2 Transposons

Contrairement au plasmide, le transposon ne peut se répliquer de façon autonome, il doit donc se retrouver dans un plasmide ou un chromosome bactérien. Cet élément est composé d'une courte séquence d'ADN qui peut se déplacer entre des plasmides, entre un plasmide et le chromosome bactérien ou entre un plasmide et un virus bactérien (bactériophage). La présence des antibiotiques peut permettre l'expression des gènes de résistance présents sur le transposon et augmenter le taux de transfert de ces gènes [288]. Il y a également les transposons conjugatifs (TC) qui peuvent s'exciser et se transférer par eux-mêmes du chromosome donneur au chromosome receveur ou à un plasmide. Ces types de transposon sont autant responsables du transfert des gènes de résistance que les plasmides chez les bactéries à Gram-positif. Ces transposons auraient également un plus grand spectre d'hôte que les plasmides. C'est-à-dire, le transfert peut se faire autant entre les espèces faisant partie des bactéries à Gram-positif que celles faisant partie des bactéries à Gram-négatif, mais également un transfert allant de bactéries à Gram-positif vers celles à Gram-négatif [288]. Ces transposons ont été classés comme des éléments d'intégration conjugatif (ICE). Les TC ont été associés à de la résistance aux tétracyclines et aux MLS_B , et également à la résistance à la vancomycine de type vanB2. Les membres de la famille Tn916/Tn1545 comprennent les transposons conjugatifs classiques ayant un large éventail d'hôtes et portant des déterminants de résistance d'importance clinique retrouvés chez une grande diversité de genres bactériens [331]. De plus, les TC sont capables de co-transférer d'autres plasmides et transposons, et également de faciliter le transfert de longs fragments chromosomiques [333]. Il y a également les transposons composites. Ces derniers doivent leur mobilité intracellulaire à la présence de copies de séquences d'insertion de la même famille les entourant et agissant ensemble afin de mobiliser l'ADN entre eux, les formant ainsi tels qu'ils sont. Ils sont majoritairement associés à la résistance élevée envers la gentamicine ou à la résistance aux glycopeptides de type vanB1.

Figure 9. Structures des transposons de chacun des trois groupes transférant des gènes de résistance aux antibiotiques chez les entérocoques (modifié selon [29]).

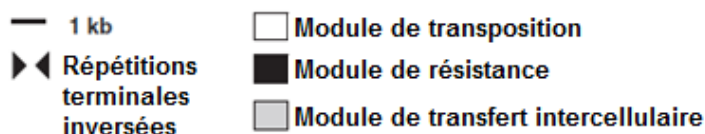
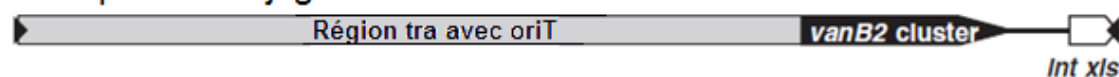
Transposon composite Tn5281



Transposon Tn1546 de la famille Tn3



Transposon conjugatif Tn1549-/Tn5382-like



Légende : *aac6'-aph2''*, aminoglycoside-6'-N-acétyltransférase-2''-O-

phosphoryltransférase; *tnpA*, transposase; *tnpR*, résolvase; *vanA/vanB2* cluster, opérons *vanA/vanB2* conférant la résistance à la vancomycine; région *tra*, région contenant les gènes de transfert; *oriT*, origine de transfert; *xis*, excisionase; *int*, intégrase.

Le tableau XI ci-bas démontre la grande diversité des transposons qui ont été retrouvés chez les entérocoques jusqu'à présent.

Tableau XI : Transposons détectés chez les entérocoques (modifié selon [29]).

Famille transposons Tn3		
Désignation (s) Tn	Taille (kb)	Résistance (gènes)
Tn917 (Tn551)	5,3	Macrolides, Lincosamides et
Tn5371	5,1	Streptogramine B (<i>erm</i> (B))
Tn1546 et variants	11	Glycopeptides (<i>vanA</i>)
Transposons composites		
Désignation (s) Tn	Taille (kb)	Résistance (gènes)
Tn5381 (Tn4001), Tn3706 et leurs variants	4,7	Aminoglycosides (<i>aac</i> (6')- <i>Ie-aph</i> (2'')- <i>Ia</i>)
Tn924	27	Aminoglycosides (<i>aac</i> (6')- <i>Ie-aph</i> (2'')- <i>Ia</i>)
Tn1547	64	Vancomycine (<i>vanB1</i>)
Tn5384	26	Aminoglycosides (<i>aac</i> (6')- <i>Ie-aph</i> (2'')- <i>Ia</i>), Érythromycine (<i>erm</i> (B)), mercure (<i>mer</i>)
Tn5385	Ca. 65	Aminoglycosides (<i>aac</i> (6')- <i>Ie-aph</i> (2'')- <i>Ia</i>), Érythromycine (<i>erm</i> (B)), Mercure (<i>mer</i>), Streptomycine (<i>aadE</i>), Tétracycline-Minocycline (<i>tet</i> (M)), Pénicilline (<i>blaZ</i>)
Tn5405 et variants	12	Aminoglycosides (<i>aph</i> (3')-IIIa, <i>aadE</i>), Streptothricine (similaire à <i>sat</i> (4))
Tn5482	26-30	Glycopeptides (<i>vanA</i>)
Tn5506	39	Glycopeptides (<i>vanA</i>)
Transposons conjugatifs (ICEs)		
Désignation (s) Tn	Taille (kb)	Résistance/virulence (gènes)
Tn916, Tn918, Tn919, Tn920, Tn925, Tn3702, Tn5031, Tn5032, Tn5033, Tn5381, Tn5383	15-23	Tétracycline-Minocycline (<i>tet</i> (M))
Tn1545 et variants	Ca. 25	Tétracycline-Minocycline (<i>tet</i> (M)), Macrolides, Lincosamides et Streptogramine B (<i>erm</i> (B)), Kanamycine (<i>aph</i> (3')-IIIa)
Tn6009	18	Tétracycline-Minocycline (<i>tet</i> (M)), Mercure (<i>mer</i>)
Tn5382, Tn1549 et leurs variants	27-34	Vancomycine (<i>vanB2</i>)
Tn5386	29	Lantibiotiques (<i>spa</i>), protéine de surface putative d'adhésion au collagène
Homologue du transposon conjugatif OG1RF	Ca. 49	Protéines putatives d'adhésion
Tn6000/EfcTn1	33	Tétracycline (<i>tet</i> (S))
CW459TetM/Tn5801 (Tn6104)	Ca. 25	Tétracycline-Minocycline (<i>tet</i> (M))
Élément de V583 contenant <i>vanB1</i>	55	Vancomycine (<i>vanB1</i>)
Tn5397 et variants	Ca. 21	Tétracycline-Minocycline (<i>tet</i> (M))
Tn950	47	Érythromycine

2.2.3.3 Intégrons

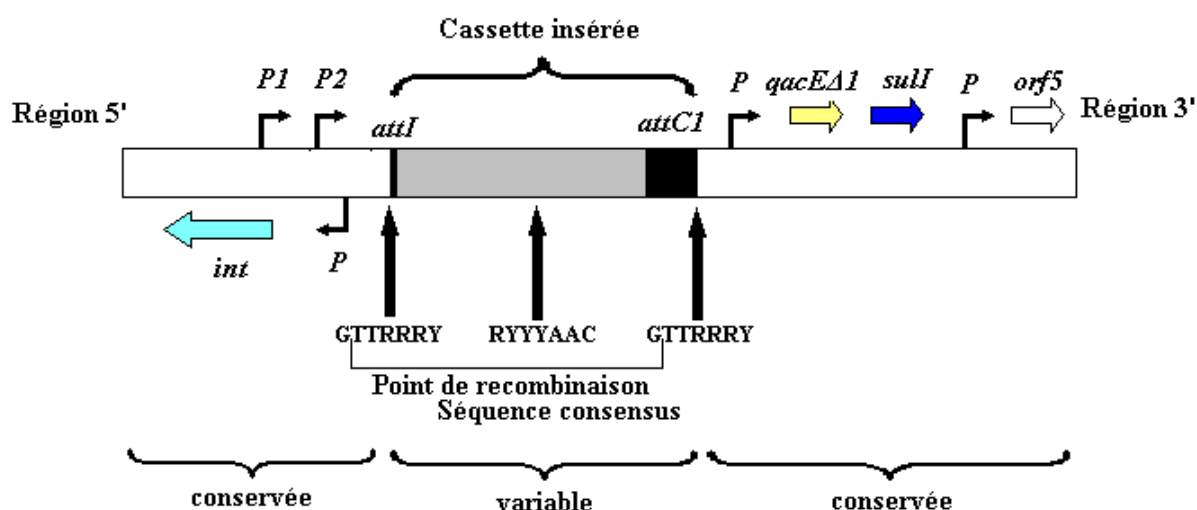
L'intégron est un élément génétique susceptible d'acquérir ou de perdre des gènes de résistance aux antibiotiques. Les intégrons peuvent contenir des éléments mobiles, nommés cassettes, possédant la plupart du temps des gènes de résistance aux antibiotiques. Les cassettes sont intégrées ou excisées par un système de recombinaison spécifique à l'aide d'une intégrase. On retrouve principalement les intégrons au niveau des bactéries à Gram-négatif, mais parfois également chez celles à Gram-positif. On retrouve les intégrons tant au niveau des plasmides, des transposons que du chromosome bactérien [357].

Les intégrons contiennent deux régions 5' et 3' conservées, entre lesquelles peuvent s'intégrer dans la région variable une ou plusieurs cassettes de gènes. Les cassettes n'ont pas de gènes codant pour un enzyme catalysant leur mouvement contrairement aux transposons. L'intégron possède trois éléments essentiels : le gène intégrase (*intI*), un site primaire de recombinaison (*attI*) et un promoteur de haute expression. C'est la région 5' immobile qui contient un gène *intI* codant pour l'intégrase IntI. L'intégrase reconnaît un site de recombinaison spécifique sur la cassette, *attC*. Selon le type d'intégrase, trois classes d'intégron ont été identifiées, les classes 1, 2 et 3 portant le nom des intégrases correspondantes [357]. L'intégron contient également un ou plusieurs cadres de lecture ouvert (ORF) codant pour des protéines/enzymes métaboliques. Les produits de ces gènes sont des enzymes qui peuvent dégrader les molécules d'antibiotiques ou les modifier pour les rendre inactives. Son contenu lui permet ainsi d'intégrer et de supprimer des cassettes de gènes par un système impliquant la capture, la mobilisation et l'expression de ces cassettes conférant la résistance à différents antibiotiques [358].

Il existe trois classes d'intégron à multiple résistance aux antibiotiques retrouvées dans les plasmides et les transposons, et une quatrième, le superintégron retrouvé dans le chromosome de *Vibrio cholerae*. Les intégrons sont classés selon l'homologie du gène intégrase et du site *attI* [359]. On retrouve la plupart du temps les intégrons de classe 1, contenant le gène *intI1* codant pour l'intégrase du même nom, dans les transposons de la famille Tn21. Les intégrons de classe 2 se retrouvent sur le transposon Tn7 et ses dérivés. Ils possèdent le gène *intI2* codant pour l'intégrase du même nom. Un seul

intégron de classe 3 a été identifié et son intégrase a 61% d'homologie avec celle des intégrons de classe 1 [358]. Il faut dire que la région 3' de chacune des trois classes est bien différente. Celle des intégrons de classe 1 contient trois ORF (figure 10). Le premier cadre porte le gène *qacEΔ1*, qui est un dérivé tronqué du gène *qacE* codant pour une protéine de résistance aux ammoniums quaternaires. Le second, nommé *sulI*, code pour une protéine de résistance aux sulfamides et finalement, le dernier code pour une protéine n'ayant aucune fonction connue et se nomme *ORF5* [357]. Pour ce qui est de l'intégron de classe 2, sa région 3' code pour des gènes *tns* nécessaires à la transposition de Tn7. La région 3' de l'intégron de classe 3 n'a pas encore été caractérisée. Les intégrons sont, en résumé, un système original de capture des gènes capables de promouvoir efficacement la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques au sein du monde bactérien [360].

Figure 10. Structure générale de l'intégron de classe 1. Les flèches indiquent la direction de la transcription. La région GTTRRRY représente la séquence d'intégration des cassettes et se nomme 'core', tandis que la région RYYAAC se nomme 'core inverse'.



Les intégrons ont toujours été décrits dans les bactéries à Gram-négatif jusqu'à la découverte de leur présence chez les bactéries à Gram-positif en 1990. En 1998, seulement deux cas avaient été rapportés. Un de ces cas a été décrit chez *E. faecalis*. Ces

intégrons semblaient être de classe I et contenaient seulement des résistances associées aux aminoglycosides (streptomycine et spectinomycine). Le transfert de l'intégron, contenant le gène *aadA*, a été démontré vers la souche réceptrice *E. faecalis* JH2-2 à un faible taux. Il a semblé que le gène *aadA* était le seul gène de résistance inséré dans l'intégron puisque le produit PCR n'était pas assez grand pour contenir d'autres cassettes [361].

Dû au fait que les bactéries à Gram-négatif de la famille des *Enterobacteriaceae* sont d'importantes causes d'intoxications alimentaires, une très forte attention a toujours été portée sur les gènes de résistance aux antibiotiques de ce groupe de bactéries intestinales. Les intégrons de classes 1 et 2 ont été le plus souvent retrouvés chez les bactéries colonisant le tractus gastrointestinal des animaux de consommation [357]. Plus récemment, Xu et ses collègues [362] ont observé pour la première fois, la présence d'intégrons de classe I chez l'espèce *E. faecium*, mais également la présence d'un intégron de classe II chez *E. faecalis* d'origine clinique isolé de l'humain. La cassette de ces intégrons codait principalement pour de la résistance aux aminoglycosides et au triméthopime.

2.2.3.4 Îlots de pathogénie

Les îlots de pathogénie (PAI) sont une classe distincte d'îlots génomiques qui peuvent être acquis par transfert génétique horizontal. Ils sont incorporés dans le génome des microorganismes pathogènes et sont habituellement absents de ceux non pathogènes de la même espèce. Ils occupent généralement de larges régions génomiques allant de 10 à 200 kb et codent pour des gènes contribuant à la virulence du microorganisme pathogène en question. Les PAIs sont des éléments génétiques entourés de répétitions directes, de séquences d'insertion ou de gènes de l'ARN de transfert, lesquels sont des sites pour la recombinaison dans l'ADN génomique.

Le premier génome d'*Enterococcus faecalis* séquencé, soit la souche résistante à la vancomycine V583, est formé de plus de 25 % d'éléments mobiles, dont un grand îlot de pathogénie d'environ 150 kb [8]. Le PAI d'*E. faecalis* V583 coderait pour 129 ORFs potentiels, incluant les facteurs de virulence Esp, la cytolysine et la SA [173]. La présence de protéines d'intégration, d'origine phagique, et d'excision, de fonctions

homologues de conjugaison des plasmides, et de répétitions directes de terminaison, suggère que le PAI se déplace de la même façon qu'un élément d'intégration conjugatif (ICE). Une étude de Manson et ses collaborateurs [363] a démontré que le transfert était possible sans la nécessité de ces gènes. Selon leur expérimentation, ils ont observé un transfert seulement lorsque les donneurs possédaient un type de plasmide conjugatif répondant aux phéromones, et ce transfert était invariablement accompagné des séquences chromosomiques environnantes des donneurs. Par contre, ils n'excluent pas la possibilité d'un mécanisme de transfert de type ICE dans d'autres environnements que celui testé. Une étude récente a démontré le transfert intra- et inter-espèce (*E. faecalis* et *E. faecium*) entier de l'îlot de pathogénie de la souche *E. faecalis* UW3114 grâce à la présence du plasmide répondant aux phéromones pLG2, lequel code pour de la résistance à l'érythromycine, la streptomycine et la streptothricine [364]. Ce type de transfert supporte le rôle du transfert horizontal des gènes de résistance aux antibiotiques et de la pression sélective dans l'établissement de certains entérocoques en tant que pathogène nosocomial.

Le séquençage généralisé des génomes semble nous démontrer que les PAIs sont beaucoup plus disséminés que ce que l'on croyait [365]. Dans le genre *Enterococcus*, deux PAIs ont été décrits : le premier est celui décrit précédemment, et le second a été retrouvé chez une souche nosocomiale *E. faecium* [119]. Chez cette dernière, c'est grâce à la présence du gène de virulence *esp* que le PAI a été découvert. Leavis et al. [119] ont séquencé les régions chromosomales adjacentes au gène *esp*, ce qui a révélé la présence de sept cadres de lecture représentant des gènes impliqués dans la virulence, dans la régulation de la transcription et dans la résistance aux antibiotiques. Les deux premiers cadres de lecture de ce PAI hypothétique codent pour des régulateurs transcriptionnels (un facteur sigma-like et une protéine appartenant à la famille AraC des régulateurs). En plus du gène de virulence *esp* (ORF3), deux autres gènes de virulence putatif (ORF4 et 5) ont été séquencés (*nox* et de la muramidase). Ces gènes codent pour une NADH oxydase et une muramidase ou autolysine, respectivement. Les deux derniers ORFs sembleraient coder pour une protéine de bactériophage et une pompe à efflux de multirésistance. La fonction exacte de la protéine de phage n'est pas encore déterminée. Même si la virulence et la résistance aux antibiotiques sont souvent liées [366], les gènes

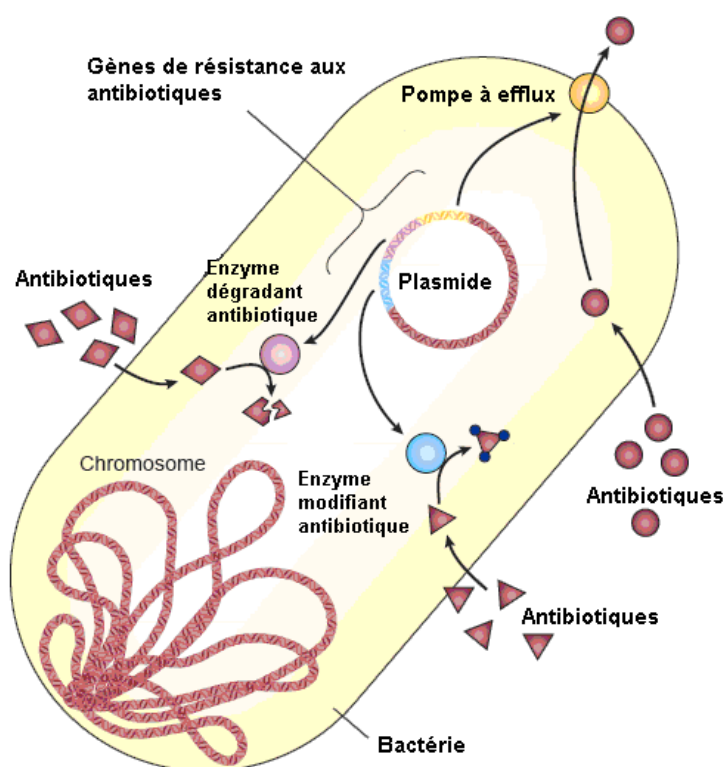
de résistance aux antibiotiques sont rarement retrouvés sur les PAIs. Cependant, un PAI contenant un locus de résistance envers la streptomycine, l'ampicilline, le chloramphénicol et la tétracycline a déjà été retrouvé chez l'espèce *Shigella flexneri* [367, 368]. De par la présence de gènes de virulence, d'un contenu faible en %GC comparativement au reste du génome, et à la présence du gène *esp* chez des isolats *E. faecium* associés à des épidémies nosocomiales et des infections cliniquement documentées, Leavis et al. ont conclu que cet élément génétique constituait un îlot de pathogénie, le premier décrit chez l'espèce *E. faecium* [119]. Par contre, la majorité des études sont effectuées sur des isolats cliniques de l'espèce *E. faecalis*. Ainsi, une étude récente [369] a démontré la propagation globale des PAIs chez *E. faecalis* à travers des isolats de différentes localisations et origines. De plus, Semedo-Lemsaddek et ses collègues ont analysé 40 isolats d'entérocoques de différentes origines et de différentes espèces. Ils ont pu ainsi observer la présence de PAI à travers des entérocoques provenant de lait de brebis et de fromage, et de différentes espèces telles que *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus*, *E. durans*, et *E. hirae*. Ces PAI ont été découvert par la détection de gènes associés à cet îlot. Des isolats de différentes origines et contenant ces gènes ont été sélectionnés afin de déterminer l'organisation génétique des PAI par comparaison à des contrôles positifs (MMH594, *E. faecalis* PAI entier; V584, *E. faecalis* PAI avec délétion; E300, *E. faecium* PAI putatif). Une diversité dans l'organisation génétique a été observée (par exemple la présence de l'opéron cytolysine) [370]. Cette diversité doit probablement refléter l'habileté des entérocoques d'acquérir et de partager du matériel avec d'autres bactéries colonisant la même niche écologique. Ces observations suggèrent donc une très grande dissémination et un très grand potentiel de pathogénie chez le genre *Enterococcus* [370].

2.2.4 Mécanismes de résistance

L'homme se protégeant des infections ainsi que le besoin de satisfaire aux exigences de production animale de plus en plus élevées, ont provoqué une évolution chez les bactéries. Le besoin d'augmenter les performances zootechniques et de réduire la maladie dans les troupeaux a engendré la mise en place de différents usages des antibiotiques comme facteurs de croissance et en prophylaxie ainsi qu'en traitement

thérapeutique. On assiste à une adaptation des microbes due à la pression de sélection engendrée par les antibiotiques. Pour ce faire, des mutations et des gènes de résistance sont apparus. Ceux-ci permettent aux bactéries de contrer leur disparition par l'expression de ces gènes permettant l'exploitation de mécanismes de résistance aux antibiotiques. Ces principaux mécanismes sont présentés schématiquement dans la figure 11.

Figure 11. Mécanismes de résistance de la bactérie (adapté de [290]).



Les mécanismes de résistance peuvent varier (Figure 11). Certains sont dirigés envers l'antibiotique même : des enzymes tels que les bêta-lactamases détruisent les pénicillines et les céphalosporines, d'autres modifient le chloramphénicol et les aminoglycosides en les rendant inactifs. D'autres mécanismes ciblent le système de transport de l'antibiotique; par exemple, des pompes à efflux actif sont connues pour causer de la résistance envers les tétracyclines, le chloramphénicol et les fluoroquinolones. Un troisième type de mécanisme (non-montré dans la figure 11) altère la cible intracellulaire de l'antibiotique; par exemple le ribosome, des enzymes

métaboliques ou des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN ou de la paroi cellulaire rendant l'antibiotique incapable d'inhiber les fonctions vitales de la bactérie [290].

Il existe plus de 15 classes d'antibiotiques dont leurs cibles sont impliquées dans les fonctions physiologiques et métaboliques essentielles de la bactérie (Tableau XII). Aucune n'a échappé à l'apparition d'un mécanisme de résistance [290].

Tableau XII : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques (adapté de [47, 269, 371-373])

Type de mécanisme de résistance	Mécanisme de résistance spécifique ^a	Classe d'antibiotique (antibiotique)
Inactivation de l'antibiotique	Dégradation enzymatique (bêta-lactamases)	Bêta-Lactamines
	Modification enzymatique (Phosphotransférase, adényltrasférase, acétyltrasférase)	Aminoglycosides
	Dégradation enzymatique (CAT)	Phénicoles
	Dégradation enzymatique (Acétyltrasférase)	Streptogramines A
	Dégradation enzymatique (Nitrofurane réductase)	Nitrofuranes
Reflux actif et imperméabilité à l'antibiotique	Pompe à efflux par transporteur membranaire	Tétracyclines
	Pompe à efflux par transporteur membranaire	Macrolides
	Pompe à efflux par transporteur membranaire	Quinolones
	Diminution de la perméabilité cellulaire	Polymyxines
	Pompe à efflux par transporteur membranaire	Polypeptides (bacitracine)
	Changement de la perméabilité de la membrane externe	Aminoglycosides
	Pompe à efflux par transporteur membranaire	Phénicoles

Tableau XII (Suite).

Type de mécanisme de résistance	Mécanisme de résistance spécifique	Classe d'antibiotique (antibiotique)
Modification de la cible de l'antibiotique	Méthylation site actif du ribosome	Macrolides, Lincosamides, Streptogramine B
	Modification de la cible (nucléotidyltransférase)	Lincosamides
	Méthylation du ribosome	Orthosomycine (Avilamycine)
	Mutation ou recombinaison des gènes codant pour DHPS	Sulfamides
	Mutation ou recombinaison des gènes codant pour DHFR	Triméthoprimes
	Mutation des gènes codant pour ADN gyrase et topoisomérase IV	Quinolones
	Modification du complexe D-Ala-D-Ala	Glycopeptides
	Modification de la cible PBP et surproduction	Bêta-lactamines
	Protection et modification de la cible ribosomale	Tétracyclines
Résistance de la cible	Surproduction de la cible (DHFR)	Triméthoprimes
	Surproduction de la cible dans le peptidoglycan	Glycopeptides
	Surproduction de la cible (undecaprenol monophosphate) par l'enzyme undecaprenol kinase	Polypeptides (Bacitracine)

^a CAT, chloramphénicol acétyltransférase; DHPS, dihydroptéroate synthase; DHFR, dihydrofolate réductase; PBP, penicillin-binding protein.

3. Antibiorésistance chez les entérocoques

3.1 Résistance naturelle

La résistance intrinsèque réfère à l'existence de gènes dans le génome bactérien qui peuvent générer un phénotype de résistance. Différents genres, espèces, souches, démontrent une grande diversité de phénotypes de réponse aux antibiotiques. La disponibilité de techniques de mutagenèse pour l'étude du génome entier et le séquençage, aujourd'hui rapide, a révélé plusieurs gènes fonctionnels potentiels/intrinsèques chez les bactéries qui peuvent mener à des phénotypes de résistance dans des situations cliniques [280].

Les entérocoques, en tant que membres de la microflore intestinale de l'homme et des animaux, démontrent une résistance intrinsèque *in vitro* et/ou *in vivo* modérée envers plusieurs antimicrobiens utilisés au niveau clinique (bêta-lactamines, aminoglycosides, clindamycine et lincomycine, triméthoprim/sulfaméthoxazole, quinolones, streptogramines A et glycopeptides). La résistance intrinsèque modérée réfère à une tolérance de la bactérie face à un antibiotique (exemple : CMI/CMB bêta-lactamines ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ chez l'espèce *E. faecium*). Cette résistance intrinsèque à plusieurs antibiotiques peut avoir engendré un avantage cumulatif des entérocoques dans l'acquisition de gènes codant pour de la résistance à de fortes concentrations envers d'autres antimicrobiens [374]. La résistance complète ou partielle aux bêta-lactamines, particulièrement les céphalosporines et les pénicillines pénicillinase-résistantes, est une caractéristique du genre *Enterococcus*. Ensuite, tous les entérocoques possèdent une résistance modérée aux aminoglycosides avec des CMIs allant de 4 à 256 $\mu\text{g/ml}$. De plus, il est intéressant d'observer que les entérocoques sont résistants à des niveaux cliniques envers les lincosamides que sont la clindamycine et la lincomycine. Par contre, il faut noter que ce n'est pas toutes les espèces d'*Enterococcus* qui ont des résistances intrinsèques (ex. : *E. durans*). L'espèce *E. faecalis* est décrite comme ayant une résistance naturelle aux streptogramines A. Il semble que cette résistance, tant aux lincosamides qu'aux streptogramines A, serait due à la présence du gène *lsa* dont la séquence en acides aminés serait similaire à une protéine transmembranaire de type transporteur ABC à efflux actif [375]. La résistance modérée envers la vancomycine est caractérisée par des CMIs allant de 8 à 32 $\mu\text{g/ml}$, mais ayant une susceptibilité à la

téicoplanine (CMI < 4 µg/ml) et est une propriété de la plupart des espèces *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* et *Enterococcus flavescens* [374]. Le tableau XIII démontre bien les antimicrobiens dont la résistance intrinsèque est décrite dans le genre *Enterococcus* ainsi que leur mécanisme de résistance correspondant.

Tableau XIII : Résistance intrinsèque aux antimicrobiens chez les entérocoques.

Antimicrobiens	Mécanisme de résistance intrinsèque
Bêta-lactamines	Surproduction de PBP de faible affinité et/ou diminution d'affinité pour la liaison des bêta-lactamines
Aminoglycosides	Membrane cellulaire imperméable, faible entrée, et manque d'une chaîne de transport d'électrons
Clindamycine et lincomycine (<i>E. faecalis</i>)	Faible entrée et faible perméabilité
Quinolones	Faible perméabilité, entrée réduite et environnement anaérobie
Triméthoprim-sulfaméthoxazole	Résistance <i>in vivo</i> par l'utilisation de folates exogènes
Streptogramines A (<i>E. faecalis</i>)	Entrée réduite par transporteur ABC
Glycopeptides (<i>E. gallinarum</i> et <i>E. casseliflavus</i>)	Présence d'une ligase D-Ala-D-Ser (phénotype VanC)

Les entérocoques sont beaucoup plus résistants de façon intrinsèque envers les antimicrobiens que d'autres bactéries à Gram-positif cliniquement importantes, mais la raison de cette observation est encore malconnue. Une des hypothèses est que cette résistance naturelle résulterait de leur besoin de survivre et de persister dans des écosystèmes, hautement compétitifs et potentiellement défavorables, tels que le tractus gastrointestinal [374].

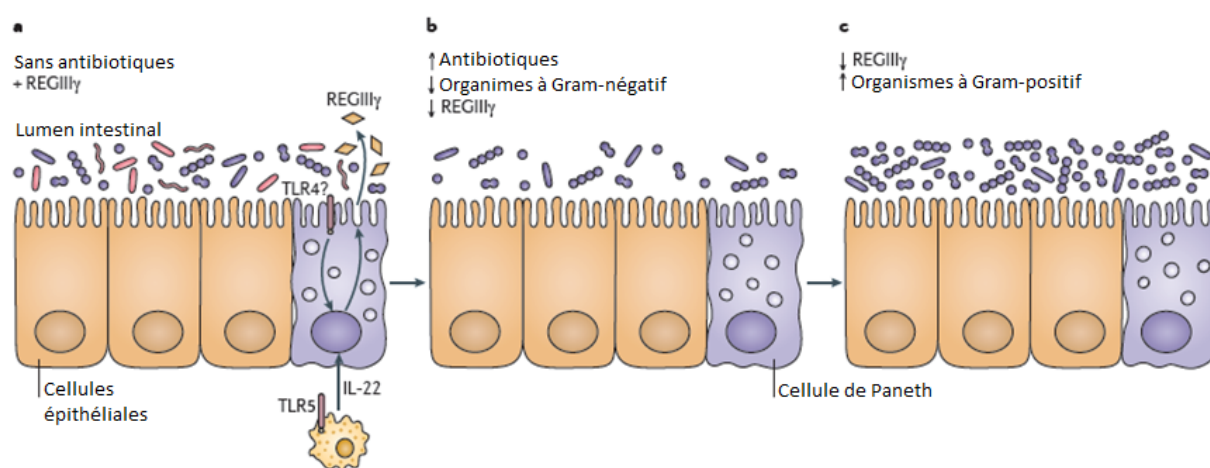
3.2 Résistance acquise

Les entérocoques sont des bactéries résistantes intrinsèques à une grande variété d'antimicrobiens rendant ainsi un choix limité des antibiotiques à utiliser contre ce microorganisme. Puisque les entérocoques sont devenus des pathogènes importants à

travers le monde au niveau des infections nosocomiales, de nombreux et différents antibiotiques ont été utilisés en milieu hospitalier. De plus, les mêmes antibiotiques, ou ceux étant de la même classe, ont été largement utilisés en tant que promoteur de croissance en production animale. Les entérocoques ont évolué de façon à acquérir de la résistance à chacun de ces antibiotiques de façon croisée, soit par l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques codés par des plasmides ou des transposons provenant d'autres microorganismes, soit par des mutations spontanées leur donnant ainsi un niveau de résistance plus élevée [376]. Cette résistance a été acquise et disséminée à travers les entérocoques via le transfert horizontal d'éléments génétiques mobiles. Cette transmission s'est faite principalement par les plasmides conjugatifs de type répondant aux phéromones et ceux à large éventail d'hôte du groupe d'incompatibilité 18 (Inc18) [32]. La forte tendance des entérocoques d'acquérir et d'exprimer de nouveaux déterminants de résistance améliore davantage leur habileté à supporter la pression sélective des antibiotiques, permettant ainsi de promouvoir la colonisation gastrointestinale et déclencher des infections nosocomiales par ces entérocoques. En tant que résidents de la flore intestinale de l'homme et des animaux, les entérocoques sont en position d'acquérir des gènes de résistance provenant d'autres commensaux, qui peuvent être par la suite transférés à d'autres bactéries plus pathogènes [29]. D'un autre côté, certains diront que les entérocoques ne représentent qu'un faible pourcentage de la microflore intestinale de l'homme et des animaux et qu'ainsi, ils ne jouent guère un rôle majeur dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Au contraire, par exemple, il est décrit que l'exposition aux antibiotiques de patients hospitalisés résulte en des changements substantiels dans le microbiome intestinal facilitant la colonisation du tractus gastrointestinal par des ERV [377, 378]. Des travaux, utilisant des modèles murins pour l'étude de la colonisation intestinale, ont fourni des informations sur les mécanismes par lesquels les ERV, ou des entérocoques multirésistants, prenaient le dessus dans l'intestin après une exposition aux antibiotiques [379]. Ces études ont trouvé que le LPS et la flagelline des bactéries à Gram-négatif, incluant les anaérobies, stimulaient (via des interactions avec les récepteurs « Toll-like ») [379, 380] la production de REGIII γ par les cellules de Paneth (Figure 12) (cellules sécrétrices d'enzymes à activité antimicrobienne et absentes du colon afin de ne pas interférer avec

la flore intestinale). REGIII γ est une lectine de type C ayant une activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram-positif, incluant les ERV [379]. L'atténuation des bactéries à Gram-négatif par les antibiotiques diminue la production de REGIII γ et facilite ainsi la surcroissance des ERV, ou entérocoques multirésistants, dans le tractus gastrointestinal [379, 380]. Cela met en évidence le rôle du microbiome intestinal dans la modulation de la colonisation par des microorganismes multirésistants (Figure 12).

Figure 12. Les effets de l'administration d'antibiotiques sur le microbiome intestinal et l'émergence des entérocoques multirésistants (selon [381]).



Légende : (a) En absence d'antibiotiques, les cellules intestinales de la souris et les cellules de Paneth produisent la lectine de type C REGIII γ , laquelle possède une activité antimicrobienne envers les bactéries à Gram-positif (pourpre). La production de REGIII γ est enclenchée par la présence de bactéries à Gram-négatif (rose); leurs PMAMs (profil moléculaire associé au microorganisme), tels que le LPS (dans le lumen intestinal) et la flagelline (dans les tissus sous-épithéliaux), sont reconnus par les récepteurs de reconnaissance des profils (ex. : TLR4 et TLR5), respectivement. (b) L'administration d'antibiotiques amène une réduction des bactéries à Gram-négatif, diminuant par le fait même la production de REGIII γ par les cellules épithéliales intestinales et les cellules de Paneth. (c) Les entérocoques prennent avantage de cette réduction dans la sécrétion de REGIII γ en devenant un membre dominant du microbiome intestinal. IL-22, interleukine-22 (famille IL-10, puissant médiateurs de la réponse cellulaire inflammatoire).

3.2.1 Résistance acquise des entérocoques d'origine aviaire et porcine

C'est au cours des années 40 et au début des années 50 que les producteurs d'animaux de consommation se sont aperçus de l'effet bénéfique des aliments supplémentés, avec divers agents antimicrobiens, sur le taux de croissance des animaux. Dans les années 50, les antibiotiques ont été ajoutés aux aliments commerciaux destinés à la volaille, le bovin et le porc aux États-Unis [382], et cela est devenu une pratique commune à travers le monde. Plusieurs agents antimicrobiens utilisés en tant que promoteur de croissance chez les animaux sont similaires ou identiques à ceux retrouvés en thérapie humaine. Ceci représente un danger potentiel ou établi pour la santé humaine dû au risque de transfert de bactéries résistantes, ayant des gènes de résistance, allant des animaux de production vers l'homme [16]. Par contre, selon établi par Santé Canada, les usages vétérinaires des promoteurs de croissance sont principalement des antibiotiques de catégorie II et III (niveau d'importance en médecine humaine) et que la catégorie I est utilisée qu'en dernier recours en élevage afin d'éliminer ce genre de situation (Tableau XIV) [383].

Tableau XIV. Liste des principales substances antimicrobiennes utilisées comme facteur de croissance chez le porc à l'engraissement au Québec [384].

Antimicrobien	Classe	Catégorie (en lien avec les usages humains) ^A	Utilisation comme AFC (% des prescriptions) ^B
Virginiamycine	Streptogramines	I	0,8
Tylosine	Macrolides	II	74,4
Bacitracine	Polypeptides	III	14,9
Salinomycine	Ionophores	IV	7,4
Bambermycine C	Flavophospholipols	IV	2,5

^A Classification des antibiotiques selon leur importance en médecine humaine selon Santé Canada (voir aussi la section 2.4 de ce rapport).

^B Intensité d'utilisation des antibiotiques comme facteur de croissance dans 188 lots de porcs issus de 65 fermes porcines québécoises (Épidémio-Qualité inc., 2006).

^C La Bambermycine est un antibiotique de la famille des flavophospholipols. Cet antibiotique est homologué au Canada comme facteur de croissance chez la volaille, mais pas chez le porc. Elle est occasionnellement prescrite chez le porc pour le contrôle des salmonelles.

Les tableaux XV et XVI démontrent et résument les nombreux mécanismes de résistance ayant été acquis par *E. faecalis* et *E. faecium* chez le porc et la volaille jusqu'à ce jour, et ce, peu importe le pays d'origine.

Tableau XV. Résistance observée chez les *E. faecalis* du porc et de la volaille [264, 325, 385-395].

Classe antibiotique	Phénotype	Génotype	Mécanisme résistance	Localisation	Chez volaille (○) porc (●)
Aminoglycoside	Streptomycine, kanamycine, gentamicine, spectinomycine, streptothricine	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>aadE</i> , <i>aadA</i> , <i>sat(4)</i>	Modification enzymatique (adényl-, phospho-, acétyltransférase)	Plasmide, intégron	● ○
Ionophore	Narasin, salinomycine	ND	ND	ND	● ○
Glycopeptide	Vancomycine, avoparcine	<i>vanA</i>	Cible altérée (peptidoglycan)	Transposon, plasmide	● ○
Glycophospholipide	Flavomycine	ND	ND	ND	● ○
Macrolide	Tylosine, érythromycine	<i>erm(B)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msrC</i> , <i>mef(A/E)</i>	Cible altérée (méthylation), pompe à efflux	Transposon, Chromosome	● ○
Orthosomycine	Avilamycine, evernimicine	<i>emtA</i>	Cible altérée (méthylation ribosome)	Transposon, plasmide	● ○
Phénicole	Chloramphénicol	<i>cat-pIP501</i> , <i>cat-pSBK</i> , <i>catA</i>	Dégradation enzymatique (CAT)	Plasmide, chromosome	● ○
Polypeptide	Bacitracine	<i>bcrRABD</i>	Pompe à efflux, surproduction cible	Plasmide	● ○
Quinolone	Ciprofloxacine, enrofloxacine	<i>gyrA</i> , <i>parC</i> , <i>emeA</i>	Cible altérée (ADN gyrase, topoisomérase IV), pompe à efflux	Chromosome	● ○
Streptogramine	Virginiamycine, quinupristine-dalfopristine	<i>vat(E)</i>	Dégradation enzymatique (Acétyltransférase)	Plasmide	●
Tétracycline	Tétracycline	<i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>tet(S)</i> , <i>tet(W)</i> , <i>tet(A)</i>	Pompe à efflux, protection et cible altérée (modification site liaison ribosome)	Plasmide, chromosome	● ○

ND : Non-disponible

Tableau XVI. Résistance observée chez les *E. faecium* du porc et de la volaille [264, 325, 385, 386, 391-393, 396-398].

Classe antibiotique	Phénotype	Génotype	Mécanisme résistance	Localisation	Chez volaille (○) porc (●)
Aminoglycoside	Streptomycine, kanamycine, tobramycine, gentamicine, streptothricine, spectinomycine	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>aac(6')</i> , <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>aadE</i> , <i>aadA</i> , <i>sat(4)</i> , <i>aad9</i> , <i>aadB</i>	Modification enzymatique (adényl-, phospho-, acétyltransférase)	Plasmide	● ○
Bêta-lactamine	Pénicilline, ampicilline	<i>pbp5</i>	Cible altérée (mutation) et surproduction	Chromosome	● ○
Glycopeptide	Vancomycine, avoparcine	<i>vanA</i> , <i>vanB</i>	Cible altérée (peptidoglycan)	Transposon, plasmide	● ○
Ionophore	Narasin, salinomycine	ND	ND	ND	● ○
Macrolide	Tylosine, érythromycine	<i>erm(B)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>msrC</i> , <i>mef(A)</i>	Cible altérée (méthylation), pompe à efflux	Transposon, chromosome	● ○
Orthosomycine	Avilamycine, evernimicine	<i>emtA</i>	Cible altérée (méthylation ribosome)	Transposon, plasmide	● ○
Phénicole	Chloramphénicol	<i>cat-pIP501</i> , <i>cat-pSBK</i> , <i>catA</i>	Dégradation enzymatique (CAT)	Plasmide, chromosome	● ○
Polypeptide	Bacitracine	<i>bcrRABD</i>	Pompe à efflux, surproduction cible	Plasmide	● ○
Quinolone	Ciprofloxacine	<i>gyrA</i> , <i>parC</i>	Cible altérée (mutation site liaison)	Chromosome	● ○
Streptogramine	Virginiamycine, quinupristine-dalfopristine	<i>vat(D)</i> , <i>vat(E)</i> , <i>vat(G)</i> , <i>vga(D)</i> , <i>vat(H)</i>	Dégradation enzymatique (Acétyltransférase), pompe à efflux	Plasmide	● ○
Tétracycline	Tétracycline, oxytétracycline	<i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>tet(S)</i>	Pompe à efflux, cible altérée (modification site liaison ribosome)	Plasmide, chromosome	● ○

ND : Non-disponible

Il faut savoir que les résistances phénotypiques observées dépendront du pays d'origine des isolats et des antibiotiques y étant utilisés [399]. De plus, l'espèce étudiée aura un impact sur les données de résistances acquises. Afin d'y aller plus simplement, j'utiliserai les données disponibles au Canada, soit du programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA). Ce programme observe et surveille les phénotypes de résistance aux antibiotiques chez le genre *Enterococcus* spp. au niveau de la viande au détail du poulet, et à la ferme chez le porc. Pour ce dernier, les données n'existent que depuis l'année 2006. Selon le dernier rapport disponible (2008), nous avons également accès aux données concernant l'utilisation des antibiotiques chez le porc, soit la quantité de troupeaux les utilisant (par classe ou par antibiotique), mais également la quantité d'antibiotiques utilisés par voie d'administration (aliments, eau, injection) et par type d'utilisation (traitement de la maladie, prévention de la maladie, promoteur de croissance) [383]. Il est important de noter que le programme ne comporte pour l'instant que 96 troupeaux incluant la participation de 23 vétérinaires. C'est donc une représentation partielle de la situation au Canada.

Ainsi, les classes d'antibiotiques les plus utilisés chez le porc sont les macrolides/lincosamides suivi des pénicillines et finalement, les tétracyclines [383]. Il n'est donc pas surprenant d'observer que les profils de résistance les plus communs, peu importe l'espèce *Enterococcus*, sont la tétracycline seule, l'érythromycine, kanamycine, streptomycine, tétracycline et tylosine, et l'érythromycine, tétracycline et tylosine. Si l'on regarde plus spécifiquement au niveau de l'espèce, chez *E. faecalis*, l'occurrence de la résistance en ordre croissant consiste à : pénicilline, nitrofurantoïne, ciprofloxacine, gentamicine, chloramphénicol, kanamycine, streptomycine, érythromycine, tylosine, tétracycline. Chez les 1250 isolats identifiés, aucune résistance n'a été démontrée envers la vancomycine, la tigécycline, la daptomycine et le linezolide. Un fait intéressant à remarquer est que 80.3% des isolats *E. faecalis* démontrent de la résistance face à deux jusqu'à cinq classes d'antibiotiques. Malgré un nombre plus faible d'isolats identifiés comme étant *E. faecium* ($n = 45$), de la résistance face à 2 jusqu'à 9 classes d'antibiotiques a pu être observée. On peut également noter que l'occurrence de la résistance en ordre croissant n'est pas la même que pour l'espèce *E. faecalis*, soit : nitrofurantoïne, pénicilline, quinupristine-dalfopristine, streptomycine, tylosine,

érythromycine, ciprofloxacine, kanamycine, tétracycline, lincomycine. Chez les 45 isolats identifiés *E. faecium*, aucun n'étaient résistant à la gentamicine (concentration élevée), la vancomycine, la tigécycline, la daptomycine, le linézolide et le chloramphénicol [400].

Les profils de résistance les plus communs ayant été décrits chez les isolats *Enterococcus* spp. de la viande au détail de poulet sont envers la tétracycline seule, et l'érythromycine, tétracycline, tylosine. À l'espèce, moins d'isolats d'*E. faecalis* et *E. faecium* ont été identifiés que chez le porc, soient 426 et 8 respectivement. Malgré tout, de la multi-résistance (allant de 2 à 9 classes) est observée chez 57.8% des isolats d'*E. faecalis* et *E. faecium*, confondus. L'occurrence de la résistance en ordre croissant chez *E. faecalis* consiste à : nitrofurantoïne, ciprofloxacine, chloramphénicol, gentamicine, kanamycine, streptomycine, érythromycine, tylosine et tétracycline. Aucune résistance envers la vancomycine, la tigécycline, la daptomycine, le linézolide et la pénicilline n'a été observée. Pour *E. faecium*, en plus de ceux nommés précédemment, aucune résistance à la gentamicine et le chloramphénicol n'a également été observée. L'occurrence de la résistance en ordre croissant n'est pas la même que pour l'espèce *E. faecalis*, tel qu'observée chez les isolats du porc, soit : kanamycine, tylosine, érythromycine, nitrofurantoïne, pénicilline, ciprofloxacine, tétracycline, streptomycine, quinupristine-dalfopristine et lincomycine [400].

Un seul article canadien, paru récemment [264], a caractérisé la présence de gènes de résistance aux antibiotiques chez des isolats *Enterococcus* du poulet. Cette étude consistait à l'échantillonnage de fèces et de ceca de poulet provenant de neuf fermes commerciales en Colombie-Britannique. De ces échantillons, 74% ($n = 51$) furent identifiés comme étant *E. faecium* tandis que 10% ($n = 7$) représentaient l'espèce *E. faecalis*. La multi-résistance a été grandement observée chez ces deux espèces dont le phénotype de multi-résistance le plus commun envers la bacitracine, l'érythromycine, la tylosine, la lincomycine, la streptomycine, la gentamicine, la tétracycline et le ciprofloxacine. La détection des gènes de résistance aux antibiotiques a été effectuée grâce à l'utilisation d'une biopuce à ADN spécifique à *Enterococcus* spp. contenant 174

oligonucléotides codant pour ces résistances. Les gènes conférant de la résistance aux aminoglycosides (*aac(6')*, *aph(3')-IIIa*, *sat(4)*), aux macrolides (*erm(B)*, *erm(AM)*, *msrC*), aux tétracyclines (*tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*), aux streptogramines (*vat(E)*), à la bacitracine (*bcrR*), et aux lincosamides (*linB*) ont été détectés dans les phénotypes correspondants. Les gènes de résistance à la bacitracine et aux macrolides, *bcrR* et *erm(AM)* respectivement, ont été retrouvés chez tous les isolats *E. faecalis*. Tous les isolats résistants à la tétracycline contenaient la combinaison des gènes *tet(L)* et *tet(M)*. Les gènes de résistance les plus prévalents chez *E. faecium* étaient *aac(6')* pour la résistance aux aminoglycosides, *tet(M)* et *tet(L)* conférant la résistance aux tétracyclines, *msrC* impliqué dans la résistance aux macrolides et streptogramines B, *bcrR* pour la résistance à la bacitracine et *vat(E)* pour la résistance aux streptogramines. La combinaison des gènes de résistance la plus fréquemment détectée était *bcrR*, *erm(AM)*, *erm(B)*, *msrC*, *linB*, *sat(4)*, *aac(6')*, *aph(3')-IIIa*, *tet(L)*, *tet(M)*, *vat(E)*. Les gènes *msrC* et *linB* étaient significativement associés à l'espèce *E. faecium* [264].

Une seule étude rapporte la résistance aux antibiotiques chez des isolats *E. faecalis* provenant d'un abattoir et d'usine de transformation du porc au Canada [401]. Un total de 200 échantillons ont été prélevé suite à la saignée des carcasses et de leur pasteurisation, et au niveau de la viande de porc au détail. L'espèce *E. faecalis* a principalement été identifiée au niveau des échantillons de sang. De la résistance envers la ciprofloxacine, la daptomycine, la kanamycine et la streptomycine a été observée et la multirésistance (5 ou plus) a été détectée majoritairement chez les isolats provenant du sang [401]. Les gènes de résistance, ayant été le plus souvent détectés, étaient envers les aminoglycosides (*aac(6')*, *aph(3')-IIIa* et *aadE*), les macrolides-lincosamide (*erm(B)*, *erm(A)*, *sat(4)* et *linB*) et les tétracyclines (*tet(L)*, *tet(M)* et *tet(O)*) [401]. Aux États-Unis, une étude à grande échelle rapporte la présence de gènes de résistance aux antibiotiques chez des isolats provenant d'échantillons de fèces de porcs sélectionnés à partir de 87 sites de production porcine dans sept états différents [265]. Un total de 49 isolats *Enterococcus*, dont 28 *E. faecalis* et trois *E. faecium*, ont été utilisés pour l'analyse par biopuce à ADN, contenant 775 oligonucléotides reliés à la résistance aux antibiotiques. Les autres espèces détectées et analysées étaient *E. durans* ($n = 2$), *E. hirae* ($n = 10$), *E. solitarius* ($n = 2$), *E. casseliflavus* ($n = 2$), *E. mundtii* ($n = 1$) et *E.*

gallinarum ($n = 1$). Le gène de résistance envers les aminoglycosides ayant été le plus détecté était *aphA3*. Le gène de résistance aux lincosamides, *linB*, a été détecté dans seulement six isolats. Le gène de résistance aux macrolides le plus fréquemment décelé était *erm(B)*, soit dans 26 isolats. Le gène de résistance au chloramphénicol, *cat*, a également été observé. Plusieurs gènes de résistance aux tétracyclines ont été détectés soient *tet(O)* ($n = 27$), *tet(M)* ($n = 23$), *tet(W)* ($n = 10$) et *tet(A)* ($n = 6$) [265]. Ainsi, encore une fois, les gènes de résistance aux macrolides et aux tétracyclines, *erm(B)*, *tet(O)* et *tet(M)* respectivement, sont ceux les plus fréquemment observés chez *E. faecalis* et *E. faecium*.

Ces études démontrent l'intérêt d'utiliser les biopuces à ADN dans l'analyse et la caractérisation au niveau moléculaire de la résistance aux antibiotiques dans les populations bactériennes grâce à leur grande diversité et contenu en gènes permettant ainsi une détection simultanée de ceux-ci.

3.2.2 Résistance acquise des entérocoques provenant des animaux de compagnie

Des programmes de surveillance national et international sur la résistance aux antimicrobiens tels que SENTRY, SCOPE, SWEDRES, SVARM, FAO, DANMAP et NARMS ont été établis pour l'homme et pour les animaux de consommation dans plusieurs régions du monde. Les animaux de compagnie ne sont pas inclus dans de tels programmes malgré plusieurs recommandations à cet égard [25, 402]. Selon l'Association Médicale des Vétérinaires Américains (<http://www.avma.org>), il y aurait environ 72 millions de chiens et 81 millions de chats dans les foyers américains. Malheureusement, aucune donnée n'est disponible sur la consommation des antibiotiques chez les animaux de compagnie en pratique vétérinaire. Dernièrement, les animaux de compagnie ont été considérés comme réservoir potentiel de bactéries résistantes aux antibiotiques basé sur des cas sporadiques démontrant la transmission de souches bactériennes pathogènes entre les petits animaux et leur propriétaire [403, 404]. Le Centre de la Prévention et du Contrôle des Maladies a énoncé que les groupes immunocompromis et les enfants peuvent être à risque de contracter des infections causées par des agents zoonotiques canins (www.cdc.gov/healthypets/animals/dogs.html).

Seulement quelques études s'attardent sur la population d'entérocoques chez les animaux de compagnies et elles ciblent toutes les animaux en santé. Une étude de Guardabassi et al. [25] a observé que les antibiotiques communément utilisés lors du traitement d'infections urinaires chez les petits animaux comprenaient les classes suivantes : bêta-lactamines, céphalosporines, sulfamides, triméthoprimes, phénicol, tétracyclines, nitroimidazoles, quinolones, macrolides et lincosamides. Tandis que dans le cas d'infections du tractus respiratoire, les antibiotiques utilisés sont : pénicillines, bêta-lactamines, tétracyclines, sulfamides, triméthoprimes, phénicol, aminoglycosides et lincosamides. Une étude récente effectuée par Ghosh et al. [405] a caractérisé des entérocoques isolés des matières fécales de chiens aux soins intensifs d'un hôpital vétérinaire afin d'évaluer leur capacité de causer des infections nosocomiales et zoonotiques. Les deux espèces représentées étaient *E. faecalis* et *E. faecium*. Chez *E. faecium*, de la résistance envers l'enrofloxacin (97.3%), l'ampicilline (96.5%), la tétracycline (84.1%), la doxycycline (60.2%), l'érythromycine (53.1%), la gentamicine (48.7%), la streptomycine (42.5%) et la nitrofurantoïne (26.5%) a été démontrée. Pour ce qui est de l'espèce *E. faecalis*, la résistance était commune envers la tétracycline (59.6%), l'érythromycine (56.4%), la doxycycline (53.2%) et l'enrofloxacin (31.9%). Aucune résistance n'a été observée envers la vancomycine, la tigécycline, le linézolide et la quinupristine/dalfopristine chez les deux espèces. Peu d'études comportent des isolats cliniques et déterminent l'occurrence des gènes de résistance aux antibiotiques. Ainsi, dans une étude faite par Jackson et al. en 2010 [24], les auteurs ont déterminé les mécanismes de résistance aux antibiotiques chez des entérocoques résistants isolés de chiens et de chats aux États-Unis. Des entérocoques résistants au chloramphénicol, à la ciprofloxacine, à l'érythromycine, à la gentamicine, à la kanamycine, à la streptomycine, à la lincomycine, à la quinupristine/dalfopristine et à la tétracycline ont été analysés pour la présence des gènes correspondants. Cinq gènes de résistance à la tétracycline (*tet*(M), *tet*(O), *tet*(L), *tet*(U)) ont été détectés, dont environ 60% des isolats résistants possédaient le gène *tet*(M); *erm*(B) était largement distribué incluant 96% des entérocoques résistants à l'érythromycine. Récemment, il a été décrit que le gène *tet*(U) n'était pas un déterminant de résistance envers la tétracycline, mais plutôt un gène codant pour la région 3' terminale d'une protéine initiatrice de la réplication du plasmide

pKQ10 [406]. Cinq gènes de résistance aux aminoglycosides, dont *aph(2')-Ic*, *aac(6')-Ii* et *ant(4')-Ia*, ont également été détectés chez les isolats résistants à la kanamycine avec la majorité de ceux-ci (69%) ayant le gène *aph(3')-IIIa*. Le gène codant pour l'enzyme bifonctionnel de résistance aux aminoglycosides, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, a été détecté chez les isolats résistants à la gentamicine et *aadE* chez ceux résistants à la streptomycine. La combinaison de gènes de résistance la plus commune chez les entérocoques isolées des chiens ($n = 11$) était *erm(B)*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *tet(M)* tandis que *tet(O)*, *tet(L)* était la plus commune chez les isolats des chats ($n = 18$) [407]. Il est à noter que la combinaison des gènes *erm(B)* et *vat(E)* codant pour la résistance envers les streptogramines a déjà été détectée dans un isolat canin d'*E. faecium* résistant à la quinupristine/dalfopristine. De plus, les résistances envers les macrolides, les lincosamides et les tétracyclines semblent fortement distribuées parmi les entérocoques isolés des animaux de compagnie [408]. Il semble que la résistance à l'antibiotique de dernier recours, la vancomycine, soit assez rare chez les petits animaux [408], mais quelques cas ont déjà été rapportés. Par exemple, une étude de Torres et al. [394], effectué en Espagne, a démontré la présence d'entérocoques intestinaux résistants à la vancomycine (*vanA*) chez des animaux de compagnie en santé, soit 22.7% des échantillons de leur étude. Ainsi, des données sur les animaux de compagnie sont clairement nécessaires afin de guider les politiques d'utilisation des antibiotiques en pratique vétérinaire et également dans le but d'évaluer le risque de transmission de la résistance aux antimicrobiens vers l'homme.

3.2.3 *E. faecalis* et *E. faecium*

On pourrait noter en général que l'espèce *E. faecium* serait davantage multirésistante contrairement à ce que l'on pourrait observer pour *E. faecalis* [409]. Une des hypothèses apportées est qu'*E. faecalis* se serait mieux adapté à son hôte acquérant ainsi des facteurs de virulence liés à la colonisation lui permettant donc d'infecter, et être responsable de 90% des infections à entérocoques [17]. Par contre, les entérocoques résistants à la vancomycine sont en majorité composée de l'espèce *E. faecium* et causent des infections nosocomiales [78, 79]. Celle-ci se serait bien adaptée à l'environnement hospitalier où l'on retrouve souvent la présence d'antibiotiques. Chez l'espèce *E.*

faecalis, on retrouve le système de conjugaison unique de réponse aux phéromones. Les plasmides faisant partie de ce groupe codent en premier lieu pour la substance agrégative, mais également, très souvent pour d'autres facteurs de virulence importants dans le processus d'une infection. Ainsi, ce système étant presque exclusivement associé à l'espèce *E. faecalis* pourrait également expliquer la plus forte prévalence des facteurs de virulence chez celle-ci [28, 161, 410]. D'un autre côté, de plus en plus d'études démontrent la présence de plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques chez ce type de plasmides favorisant ainsi le transfert intra-espèce de ceux-ci [33, 411].

Une des plus récentes découvertes pouvant expliquer cette différence comprend un système de défense bien particulier, le système CRISPR (loci regroupés de courtes répétitions palindromiques à interespaces réguliers). La souche *E. faecalis* V583 isolée aux États-Unis en 1981 et résistante à la vancomycine, est le premier isolat d'*Enterococcus* à avoir été séquencé [8]. Les éléments mobiles constituent un quart de son génome et incluent trois plasmides réplicatifs indépendants, trois fragments de plasmides intégrés au chromosome, sept prophages, et un îlot de pathogénie [8, 173]. Il y a également la lignée *E. faecium* CC17 adaptée aux hôpitaux [84] ayant émergé en 1982 [135] et étant caractérisée par une abondance de gènes acquis, incluant des séquences d'insertion, de l'ADN phagique et des gènes de résistance aux antibiotiques [87]. L'analyse génomique d'un isolat d'*E. faecalis* naturellement sensible aux antibiotiques provenant d'un échantillon oral humain, soit la souche OG1RF, a révélé que cet entérocoque ne possédait pratiquement aucun ADN exogène ni d'élément mobile tel que détectés chez la souche adaptée aux hôpitaux *E. faecalis* V583 [77]. Par contre, deux éléments CRISPR ont été identifiés [77]. CRISPR est une séquence d'un système de défense, spécifique aux procaryotes, qui procure une sorte d'immunité acquise [412, 413]. Les détails du fonctionnement sont en émergence, mais en général, un petit segment d'un élément mobile envahissant est incorporé dans la séquence CRISPR entre deux répétitions palindromiques [414, 415]. Ce segment d'élément mobile est ensuite transcrit et traité au travers des palindromes afin de générer un petit ARN nommé crARN [416]. Ce dernier a pour cible les nucléases associés au CRISPR, ceux-ci étant codés par les gènes *cas* (CRISPR-associated), afin d'empêcher l'entrée d'éléments mobiles correspondant aux segments incorporés dans la séquence CRISPR [414, 416,

417]. Le système de défense CRISPR semble être bien disséminé chez les procaryotes, avec environ 90% et 45% des génomes archaé et bactérien, respectivement, possédant des loci CRISPR [418]. Des deux loci CRISPR découverts dans le génome de la souche *E. faecalis* OG1RF, un possède les gènes associés aux nucléases, *cas* (CRISPR1-*cas*), et un autre, est un locus sans gènes *cas* (CRISPR2) [77]. La souche V583 possède seulement le locus orphelin CRISPR2, n'ayant ainsi pas les gènes *cas* fonctionnels étant requis par le système de défense CRISPR [419]. De par le potentiel de limiter l'entrée d'éléments génétiques mobiles, l'équipe de Palmer et al. [420], ont déterminé s'il existait une corrélation entre la présence des loci CRISPR et l'émergence de lignées d'entérocoques résistants aux antibiotiques. En utilisant les génomes séquencés connus, jusqu'à étendre l'analyse de collection de souches historiques couvrant les ères avant et après l'introduction des antibiotiques, pour un total de 48 souches d'*E. faecalis*, ils ont trouvé une forte corrélation entre l'absence de loci CRISPR-*cas* et l'émergence de souches d'entérocoques multirésistants. Ils ont également émis l'hypothèse que l'utilisation à grande échelle des antibiotiques a permis de sélectionner des souches d'entérocoques étant capables d'acquérir de nouveaux traits, c'est-à-dire ceux ayant un système de défense déficient, amenant ultimement à l'émergence de lignées d'entérocoques remplies de gènes de résistance aux antibiotiques et/ou autres gènes mobiles. Démontrant déjà ainsi une différence dans l'acquisition des gènes de résistance chez l'espèce *E. faecalis*, il serait donc également intéressant de voir si cette différence est aussi présente entre les espèces *E. faecalis* et *E. faecium*. Dans l'étude de Palmer et al. [420], seulement huit isolats de l'espèce *E. faecium* ont été testés pour la présence de loci CRISPR et deux furent positifs. On ne peut donc conclure que cette espèce est ainsi favorisée dans l'acquisition d'ADN étranger tel que des gènes de résistance aux antibiotiques. Il sera donc intéressant d'étudier, lorsque disponible, une grande collection de souches d'*E. faecium* afin de mieux caractériser la présence de séquences CRISPR.

3.3 Transfert horizontal de la résistance aux antibiotiques par la conjugaison répondant aux phéromones

Les entérocoques acquièrent et transfèrent de la résistance envers une multitude d'antibiotiques et rendent ainsi le traitement des infections à entérocoques très difficile. Parmi les souches d'entérocoques résistantes, les ERV (entérocoques résistant à la vancomycine) sont considérés comme des pathogènes de premier plan dans les hôpitaux [421]. Les ERV démontrent une résistance élevée envers les glycopeptides, tels que la vancomycine et la téicoplanine, conférée par les génotypes *vanA* et *vanB* [422] habituellement portés par des transposons pouvant s'intégrer à des plasmides.

Les déterminants de résistance à la vancomycine, les plus fréquemment détectés et associés aux plasmides répondant aux phéromones, sont les opérons *vanA*. *E. faecium* est l'espèce dans laquelle le premier plasmide répondant aux phéromones codant pour la résistance à la vancomycine, nommé pHKK100, a été rapportée [423]. Un autre *E. faecium*, la souche R7, a démontré la présence de deux plasmides, pHKK702 (41 kb) avec intégration du transposon Tn1546, et un plasmide répondant aux phéromones, pHKK703 (55 kb; [424]). Lorsque la souche R7 fut utilisée en tant que donneuse dans un essai conjugatif, un transconjuguant résistant à la vancomycine a été isolé. Ce dernier contenait un plasmide de 92 kb, pHKK701, représentant un coïntégrat de pHKK702 et de pHKK703. Plus récemment, un autre plasmide répondant aux phéromones de phénotype VanA, soit le pBRG1, a été détecté chez la souche *E. faecium* LS10, et démontrait une capacité de transfert vers *E. faecalis* suite à la réponse face à la phéromone cCF10 [425].

Les plasmides répondant aux phéromones de phénotype VanA ont également été décrits chez l'espèce *E. faecalis*. De bons exemples sont les deux plasmides, pSL1 et pSL2, isolés en Corée à partir d'un patient et de fèces de poulet, respectivement [411]. Ces plasmides ont transféré, à fréquence élevée, de la résistance non seulement à la vancomycine, mais également à la gentamicine, à la kanamycine, à la streptomycine et à l'érythromycine vers des souches *E. faecalis*. Les deux plasmides, ayant un poids de 128.1 kb, démontraient un profil de restriction identique même si leurs hôtes n'étaient aucunement reliés. Ce résultat soulignait la possibilité d'un transfert conjugatif de la résistance à la vancomycine entre des entérocoques humains et de poulet. Un autre

plasmide VanA chez *E. faecalis*, pAM368 (107 kb) a démontré la capacité de répondre à la phéromone synthétique cAM373 et au surnageant filtré d'*E. faecalis* et de *S. aureus* [426]. Cette observation a permis de fournir un premier exemple d'un plasmide de résistance chez les entérocoques pouvant répondre à un peptide de type cAM373 de *S. aureus*. Ainsi, le transfert de cette résistance d'un entérocoque vers un staphylocoque ne peut être négligé.

Très récemment, la résistance à la vancomycine de type VanB a été décrite sur des plasmides répondant aux phéromones. Les plasmides pMG2200 (106 kb) et pMG2201 (65.7 kb) ont été détectés dans deux souches *E. faecalis* NKH15 [33]. pMG2200 contient un élément homologue à Tn1549, répond à la phéromone cCF10 et porte une région hybride régulatrice de la conjugaison formée des gènes provenant des plasmides pCF10 et pAD1.

Il n'y a pas seulement la résistance à la vancomycine qui est disséminée par les plasmides répondant aux phéromones. Plusieurs exemples de ces plasmides portant différents déterminants de résistance sont présentés dans le tableau X. Un des premiers plasmides répondant aux phéromones caractérisés, pCF10, code pour la résistance à la tétracycline sur Tn925 [427]. Les gènes de résistance aux aminoglycosides et aux bêta-lactamines ont également été associés à des plasmides répondant aux phéromones. Ces deux résistances peuvent être localisées sur un même plasmide tel que pBEM10 (70 kb) qui porte un gène de bêta-lactamase et de la résistance à la gentamicine, à la kanamycine et à la tobramycine [428]. Ce plasmide était présent dans une souche *E. faecalis* HH2 multi-résistante avec deux autres plasmides conjugatifs, et probablement répondant aux phéromones, soient pAM323 et pAM324.

Il est également important de mentionner que les plasmides répondant aux phéromones peuvent mobiliser des îlots de pathogénie entiers. Effectivement, une étude récente a démontré que l'îlot de pathogénie de l'espèce *E. faecalis* pouvait être transféré grâce au plasmide répondant aux phéromones pLG2 (66 kb), et codant pour de la résistance aux MLS_B, de façon intra- et/ou interspèce [364]. De plus, des souches *E. faecalis* portant un plasmide répondant aux phéromones peuvent détecter et répondre à des signaux de phéromones produits par d'autres genres bactériens, permettant ainsi la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques vers d'autres espèces [429]. La

production des signaux permettant l'induction de la substance agrégative chez *E. faecalis* a été observée chez *S. aureus*, *Streptococcus gordonii* et *E. hirae* [310]. Par exemple, le plasmide pSK41 des staphylocoques code pour une lipoprotéine (TraH) qui, lorsque traité, possède une activité cAD1 [430]. Les plasmides répondant aux phéromones ne semblent pas se répliquer ou s'établir efficacement dans des hôtes autres que les entérocoques. Malgré tout, une phéromone similaire à cAM373 produite par la souche *S. gordonii* Challis a facilité la mobilisation, par le plasmide pAM373, d'un plasmide co-résident non-conjugatif portant la résistance à l'érythromycine de la souche donatrice *E. faecalis* à la souche réceptrice *S. gordonii* Challis (voir figure 7) [429].

3.3.1 Blocage du transfert

E. faecalis est capable d'acquérir, d'accumuler et de disséminer des éléments extra-chromosomiques codant pour des propriétés contribuant à leur pathogenèse et à la résistance aux antimicrobiens [32]. Cette espèce possède, tel que mentionné précédemment, un système de transfert hautement efficace nommé « réponse aux phéromones » et qui implique l'expression d'une protéine d'agrégation à sa surface. Ainsi, une première étude a été faite démontrant l'inhibition de l'auto-agrégation de la bactérie *E. faecalis*, exprimant la protéine d'agrégation, par un sérum anti-N-terminal de la protéine [162]. Le but de cette étude était de caractériser en détail l'adhésine codée par le plasmide répondant aux phéromones le plus connu, pAD1, soit la protéine d'agrégation codé par le gène *asa1*. Ainsi, les chercheurs ont démontré que les protéines d'agrégation codées par 17 plasmides répondant aux phéromones étaient immunologiquement reliées. Ils ont également démontré que le domaine N-terminal de la protéine était exposé à la surface tandis que la partie C-terminale l'était moins. Une seconde étude a démontré la corrélation entre la formation d'agrégats et le transfert plasmidique efficace par l'analyse de mutants par insertion de la protéine d'agrégation [37]. Le but de cette étude était d'analyser la relation structure-fonction de la protéine d'agrégation. Afin d'identifier les domaines fonctionnels, une banque de 23 mutants par insertion de la protéine d'agrégation PrgB (plasmide pCF10) a été construite. L'analyse de ces insertions a révélé un domaine nécessaire à l'agrégation du donneur-receveur qui s'étend au-delà de la région N-terminale. De plus, des insertions dans le domaine C-

terminal de la protéine ont également réduit la formation d'agrégats. Par ce fait même, l'habileté de former des agrégats corrélait avec un transfert efficace du plasmide. Finalement, une étude précédente a utilisé des anticorps monoclonaux anti-Asc10 et polyclonaux F'ab anti-Asc10 afin de démontrer l'interaction entre la protéine d'agrégation et son récepteur, la substance de liaison, impliqués dans la conjugaison répondant aux phéromones du plasmide pCF10 et dans son transfert [36]. Effectivement, ils ont pu démontrer que ces anticorps pouvaient bloquer la formation d'agrégats et réduisaient le taux de transfert conjugatif du plasmide pCF10 qui code également pour de la résistance à la tétracycline.

Ainsi, en rappel, les objectifs détaillés de ce projet sont les suivants :

1. Caractériser la résistance aux antibiotiques phénotypique et génotypique des *E. faecalis* et *E. faecium* aviaires et porcins des abattoirs du Québec. Cet objectif consiste en la détermination des profils de résistance aux antimicrobiens et de la diversité des gènes de résistance aux antibiotiques des isolats provenant des abattoirs. En plus, elle consiste à étudier la colocalisation plasmidique des gènes de résistance aux macrolides et aux tétracyclines, deux des résistances les plus communes chez les entérocoques.
2. Détecter la présence du gène de virulence *asaI*, qui code pour la substance agrégative, chez les isolats multi-résistants, et déterminer la présence d'une association plasmidique ou d'un co-transfert de ce gène et de gènes de résistance aux antibiotiques. Cet objectif permet l'identification d'un isolat démontrant une colocalisation, qui sera utilisé dans l'objectif 3 de ce travail. La dissémination des plasmides répondant aux phéromones est également mise en évidence chez des isolats d'*E. faecalis* commensaux de la volaille et du porc du Québec.
3. Suite à la détection d'une colocalisation plasmidique du gène *asaI* et de gènes de résistance aux antibiotiques, l'interférence par un antisérum polyclonal Agg₄₄₋₅₆₀ est évalué dans le processus de conjugaison répondant aux phéromones. Cet objectif consiste en la création de l'antisérum polyclonal Agg₄₄₋₅₆₀ et de son utilisation *in vitro* lors des expérimentations de conjugaison répondant aux phéromones.
4. En plus de l'analyse d'isolats d'entérocoques commensaux, un objectif vise à caractériser et à comparer des souches cliniques d'*E. faecium* isolées d'origines humaine et canine. Cet objectif permet d'utiliser des outils d'analyse rapides et efficaces afin de déterminer des caractères spécifiques des isolats testés. De plus, ces analyses permettent d'observer des associations significatives ou non selon l'hôte. Ces associations sont déterminées pour les gènes de résistance aux antibiotiques, les gènes de

virulence, les phénotypes d'hémolyse et de la gélatinase, la formation de biofilm, la présence de familles de plasmides et des séquences CRISPR.

Ce travail permet de décrire les profils de résistance phénotypique et génotypique en contribuant en une meilleure compréhension de la résistance des isolats d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* aviaires et porcins des abattoirs du Québec. L'analyse des éléments génétiques mobiles de ces isolats augmente nos connaissances sur la plasticité génomique des entérocoques et leur grande capacité d'accumuler des gènes de résistance aux antibiotiques. Puisque nous étions face à la présence d'un plasmide répondant aux phéromones non-décrit jusqu'à présent dans un isolat *E. faecalis* aviaire, nous devons démontrer préalablement la capacité d'interférer dans le transfert horizontal de ce plasmide et également, d'interférer dans la formation d'agrégats y étant rattachée par l'utilisation d'un antiserum polyclonal SA. Ainsi, cette étude permet également d'ouvrir la porte sur de nouvelles stratégies portant sur la diminution du transfert horizontal de la résistance aux antibiotiques via le blocage de molécule impliquée dans la conjugaison répondant aux phéromones. Cette stratégie pourrait représenter une avenue intéressante dans l'interférence du transfert horizontal de la résistance aux antibiotiques pour les producteurs porcins et aviaires du Québec. Finalement, ce projet permet également d'identifier et de caractériser des facteurs associés à la virulence et à la résistance aux antibiotiques d'isolats cliniques humains et canins du Québec, Canada afin de mieux déterminer leur importance dans l'environnement hospitalier.

III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

ARTICLE I :

“Multiple-Antibiotic Resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Cecal Contents in Broiler Chicken and Turkey Flocks Slaughtered in Canada and Plasmid Colocalization of *tetO* and *ermB* Genes”

Cindy-Love Tremblay¹, Ann Letellier¹, Sylvain Quessy¹, Martine Boulianne¹, Danielle Daignault², and Marie Archambault^{1*}

¹GREMIP et Chaire de Recherche en Sciences Aviaires, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6, et ²Programme Intégré de Surveillance de la Résistance aux Antimicrobiens (PICRA), Santé Canada, 3400 Boulevard Casavant Ouest, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 8E3.

* Author for correspondence. Tel : 450-773-8521, Ext 8679; Fax : 450-778-8108

Publié dans : Journal of Food Protection, 2011. **74**(10): p. 1639-48.

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article : Je suis la première auteure de l'article. J'ai activement participé à la conception expérimentale; J'ai substantiellement effectué la recherche, l'analyse des données et écrit le manuscrit.

ABSTRACT

This study was conducted to characterize the antimicrobial resistance determinants and investigate plasmid colocalization of tetracycline and macrolide genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from broiler chicken and turkey flocks in Canada. A total of 387 *E. faecalis* and *E. faecium* isolates were recovered from poultry cecal contents from five processing plants. The percentages of resistant *E. faecalis* and *E. faecium* isolates, respectively, were 88.1 and 94% to bacitracin, 0 and 0.9% to chloramphenicol, 0.7 and 14.5% to ciprofloxacin, 72.6 and 80.3% to erythromycin, 3.7 and 41% to flavomycin, 9.6 and 4.3% (high-level resistance) to gentamicin, 25.2 and 17.1% (high-level resistance) to kanamycin, 100 and 94% to lincomycin, 0 and 0% to linezolid, 2.6 and 20.5% to nitrofurantoin, 3 and 27.4% to penicillin, 98.5 and 89.7% to quinupristin-dalfopristin, 7 and 12.8% to salinomycin, 46.7 and 38.5% (high-level resistance) to streptomycin, 95.6 and 89.7% to tetracycline, 73 and 75.2% to tylosin, and 0 and 0% to vancomycin. One predominant multidrug-resistant phenotypic pattern was identified in both *E. faecalis* and *E. faecium* (bacitracin, erythromycin, lincomycin, quinupristin-dalfopristin, tetracycline, and tylosin). These isolates were further examined by PCR and sequencing for the genes encoding their antimicrobial resistance. Various combinations of *vatD*, *vatE*, *bcrR*, *bcrA*, *bcrB*, *bcrD*, *ermB*, *msrC*, *linB*, *tetM*, and *tetO* genes were detected, and *ermB*, *tetM*, and *bcrB* were the most common antimicrobial resistance genes identified. For the first time, plasmid extraction and hybridization revealed colocalization of *tetO* and *ermB* genes on a ca. 11-kb plasmid in *E. faecalis* isolates, and filter mating experiments demonstrated its transferability. Results indicate that the intestinal enterococci of healthy poultry, which can contaminate poultry meat at slaughter, could be a reservoir for quinupristin-dalfopristin, bacitracin, tetracycline, and macrolide resistance genes.

Antimicrobial resistance is a global issue in both human and veterinary medicine. The presence of antimicrobial resistant microorganisms in fecal material of animals is becoming a matter of great concern because these microorganisms could be transmitted to humans through a contaminated food supply (34). Studies addressing this concern are mostly conducted on pathogens that pose a direct threat to human health. However, commensal bacteria of the intestinal microbial flora associated with contaminated food are becoming of interest because these commensals can harbor antimicrobial resistance determinants that can spread to animal and/or human pathogens or other commensals (32, 34). *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* are part of the normal animal and human gut flora. These bacteria are also ranked among the leading causes of nosocomial infections. Enterococci are ubiquitous in nature and resistant to various environmental conditions. Thus, they have the potential to easily spread through the food chain and contaminate water and the environment (49). These bacteria usually are found in large numbers in food of animal origin, such as cattle, pig, and poultry carcasses (30, 32), and their presence is an indication of fecal contamination, which commonly occurs during slaughter of the animals (32). In addition to their intrinsic resistance to many antimicrobials, including resistance to cephalosporins, clindamycin, and low-level to aminoglycosides and other beta-lactams, the enterococci have a remarkable capacity to acquire resistance to other antimicrobials such as ciprofloxacin (CIP), erythromycin (ERY), tetracycline (TET), linezolid (LIZ), daptomycin, quinupristin-dalfopristin (QD), and vancomycin (VAN) (9, 43, 44). Antimicrobial resistance among enterococci is not restricted to nosocomial human settings. Because large amounts of antimicrobial agents are used in animal production, the microbial flora of food animals frequently carries resistance to a range of antimicrobials, including those classified as critically important for human therapy by the World Health Organization (32). The results of previous studies have indicated that the use of avoparcin, gentamicin (GEN), and virginiamycin for growth promotion and therapy in food animals has led to the emergence of VAN- and GEN-resistant enterococci and QD-resistant *E. faecium* in animals and meat (1, 25, 32). Consequently, transfer of resistance genes or bacteria from food animals to humans is a potential problem (32). Resistance genes can be localized on plasmids, transposons, or integrons, leading to many possible multiresistance

phenotypes and coselection processes. In a recent study, acquired resistance to TET was frequently found in enterococci from poultry carrying the *ermB* gene (macrolide–lincosamide–streptogramin B resistant gene; bacteria are referred to as having MLS_B resistance) (14). However, to our knowledge, plasmid colocalization of *ermB* and *tetO* genes has not been described in enterococci. In Canada, little is known regarding the antimicrobial resistance genes harbored by enterococci of poultry origin. The purpose of this study was to determine the antimicrobial resistance profiles of *E. faecalis* and *E. faecium* isolates recovered from broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Canada and to study plasmid colocalization of *ermB* and *tetO* genes.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection and bacterial isolation. Chicken and turkey cecal contents were collected at five processing plants (four chicken and one turkey) located in the province of Quebec, Canada, during 2003 and 2004 as previously described (10). After evisceration, intestines from selected birds were placed into individual sterile plastic bags and kept on melting ice for a maximum of 8 h before culture. For each flock (chicken, $n = 51$; turkey, $n = 40$), two or three pools including cecal contents of approximately 10 birds were created. For each pool, contents were collected from the cecum of each bird using a sterile cotton swab, put in a sterile stomacher bag, and gently manually homogenized. The pooled cecal sample was mixed with 25 ml of buffered peptone water (20 g/liter; Difco, BD, Sparks, MD) until homogenization, and isolation was performed. The contents of the ceca were cultured in enterococcosel broth (Fisher Scientific, Markham, Ontario, Canada), which is a bile esculine azide medium, and incubated at 35°C for 24 h. Ten microliters of culture was then plated on enterococcosel agar (Fisher Scientific) and incubated at 35°C for 24 h. Ten suspected enterococci colonies from each sample were subcultured for purity onto blood agar (tryptic soy agar plus 5% sheep blood). Presumptive identification to the species level was based on positive results for acid production from mannitol, arabinose, and α -methyl-glucoside sugar broths and on the metallic appearance of colonies grown on Slanetz & Bartley medium (Fisher Scientific). Suspected *E. faecalis* and *E. faecium* colonies were selected for multiplex PCR identification to the species level. Strains *E. faecalis* ATCC 29212 and *E. faecium* HA-56038 were used as positive controls.

Bacterial identification. Presumptive biochemically identified *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from turkeys and broilers were confirmed by multiplex PCR assay using species-specific primer sets for the *ddl faecalis* (D-alanine–D-alanine ligase gene) and *EMI faecium* (strongly conserved *E. faecium* genomic DNA fragment) identification genes as previously described (15, 17) with minor modifications. DNA extraction was performed with the Chelex 100 (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) ebullition method, in which many loopfuls of pure colonies were mixed with 10% Chelex and boiled for 20 min. The supernatant containing the DNA was used in the multiplex PCR

by adding 5 µl of DNA to 2.5 µl of 10XPCR buffer, 0.2 mM concentrations of deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 2 mM MgCl₂, 1.25 U of Taq DNA polymerase (GE Healthcare, Baie-D'Urfe, Québec, Canada), and 200 mM concentrations of each primer in a total volume of 25 µl. DNA amplification reactions were carried out in a Whatman Biometra thermocycler (Montreal Biotech Inc., Dorval, Québec, Canada) with the following conditions: denaturation for 10 min at 94°C, 30 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 62°C, and 1 min at 72°C, and a final extension for 5 min at 72°C. For visualization of PCR products, 5 µl of each amplicon was subjected to electrophoresis in a 1.7% agarose gel stained with ethidium bromide. A TrackIt 100-bp ladder (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) was used as the marker. *E. faecalis* MA-58123 and *E. faecium* HA-56038 were used as positive controls.

Antimicrobial susceptibility testing. PCR-confirmed isolates of *E. faecalis* and *E. faecium* were tested for MICs of 17 antibiotics (Tables 1 and 2) according to the recommended Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (M31-A3 and M100-S20) (20, 21) (interpretation breakpoints indicated in parenthesis): bacitracin (BAC; ≥ 64 mg/ml), chloramphenicol (CHL; ≥ 32 mg/ml), CIP (≥ 4 mg/ml), ERY (≥ 8 mg/ml), flavomycin (FLA; ≥ 32 mg/ml), GEN (> 500 mg/ml), kanamycin (KAN; ≥ 1024 mg/ml), lincomycin (LIN; ≥ 8 mg/ml), LIZ (≥ 8 mg/ml), nitrofurantoin (NIT; ≥ 128 mg/ml), penicillin (PEN; ≥ 16 mg/ml), salinomycin (SAL; ≥ 8 mg/ml), streptomycin (STR; $> 1,000$ mg/ml), QD (≥ 4 mg/ml), TET (≥ 16 mg/ml), tylosin (TYL; ≥ 32 mg/ml), and VAN (≥ 32 mg/ml). The broth microdilution method recommended by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS; plates CMV5ACDC) was used with the Sensititre automated reading and incubation system (ARIS, Trek Diagnostic System Ltd., Cleveland, OH). *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *E. faecalis* ATCC 29212 and ATCC 51299 were used as quality controls. Breakpoints from NARMS (7) were used for BAC, FLA, KAN (high level), and TYL, and breakpoints from DANMAP (38) were used for SAL.

Detection of antimicrobial resistance genes and repetitive extragenic palindromic PCR. Detection of antimicrobial resistance determinants was performed using the PCR method with primers and conditions previously described (2, 11, 18, 23, 26, 35, 41, 45, 47, 48) with minor modifications. The isolates were examined for the presence of the following genes: *vatD* and *vatE* that encode for streptogramin acetyltransferases; the *bcrABD* operon and its regulatory gene *bcrR* that encode for both a BAC ABC transporter system and an overproduced undecaprenol kinase; *ermB* that encodes a ribosomal methylase that mediates MLS_B resistance; *msrC* that encodes for a macrolide and streptogramin B efflux pump; *linB* that confers resistance to LIN by nucleotidylation; *tetM*, *tetO*, and *tetS* that encode for TET-minocycline resistance via a ribosomal protection protein mechanism; and *vanA* and *vanB* that encode for inducible VAN resistance via the production of an altered peptidoglycan precursor. The class 1 integron *qacEdI-sulI* gene was determined as previously described (42). Specific PCR assays for detection of *tdnX* and *int* genes also were performed for *tetM*-positive isolates to demonstrate the presence of the Tn5397-like and Tn916/Tn1545-like transposons, respectively (4, 23). A 5- μ l aliquot of DNA was added to 2.5 μ l of 10X PCR buffer, 0.2 mM concentrations of dNTPs, 2 mM MgCl₂, 150 mM concentrations of each primer (500 mM for *msrC*), and 1.25 U of Taq DNA polymerase in a total volume of 25 μ l. New primer constructions (5' to 3') were as follows: *vatD* reverse, 5'-GACTTCCTAATGATGCTAT-3' (position 776, GenBank accession no. L12033); *bcrR* forward, 5'-TATAGGGTTCTCTTGCCGCT-3', and *bcrR* reverse, 5'-GTTACCCTAACATGGAGTCG-3' (forward position 3488, reverse position 3913; GenBank accession no. AY496968); *bcrA* forward, 5'-AATCCGTCATGTTGGTAGCTGCTCT-3', and *bcrA* reverse, 5'-TATTATGCACGAGCCGGAGCTTCT-3' (forward position 2492, reverse position 2805, GenBank accession no. AY496968); *msrC* forward, 5'-CTTAGGGGTTGCTCAGGAAA-3', and *msrC* reverse, 5'-AACAAAATCGTTCCCGGATA-3' (forward position 195, reverse position 392, GenBank accession no. AJ243209); and *vanA* reverse, 5'-ACCTGCAGCGGCCATCATACG-3' (position 1334, GenBank accession no. 56895). Positive and negative controls from the strain collection of the Faculty of Veterinary

Medicine at the University of Montreal (Québec, Canada) were used in all PCRs. The identity of the gene products of at least one randomly selected isolate for each gene was verified by DNA sequencing on an ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Concord, Ontario, Canada). Repetitive extragenic palindromic (Rep) PCR analysis was performed as previously described (50) to address clonality of strains.

Plasmid extraction, hybridization, and transferability. Plasmids from nine selected multiresistant isolates of *E. faecalis* harboring the *tetO* and *ermB* genes were extracted with a Midiprep Kit (Qiagen, Streetsville, Ontario, Canada) according to the manufacturer's specifications with a lysis step of 5 mg/ml lysozyme. Plasmid extracts were subjected to electrophoresis at 100 V for 80 min in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. A supercoiled DNA ladder (Invitrogen) was used as a molecular weight marker. Probes for Southern hybridization were generated by using P³²-labeled dNTPs (Perkin-Elmer, Boston, MA) instead of standard dNTPs in the amplification reaction according to the manufacturer's instructions. DNA from plasmid extractions was transferred to positively charged nylon membranes with a vacuum blotter (model 785, Bio-Rad) and probed with P³²-labeled PCR products for the selected antimicrobial resistance genes (*ermB* and *tetO*). Hybridization was carried out at 65°C overnight, and then blot were washed three times under conditions of high stringency (20X SSC [1X SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate] and 10% sodium dodecyl sulfate). Hybridized probes were detected by exposure to a radiographic film at -80°C overnight. Filter mating experiments were performed as previously described (39). The nine *E. faecalis* isolates harbouring *ermB* and *tetO* genes of the predominant multiresistant phenotype were used as donors, and *E. faecalis* JH2-2 (rif^R, fus^R; ermB⁻) was used as the recipient strain. The PCR assay described above was performed to identify both genes in the transconjugants.

RESULTS

Bacterial identification. A total of 526 isolates from both turkeys and chicken broilers were biochemically identified to genus as *Enterococcus*. Identification to the species level using the multiplex PCR assay revealed 150 *E. faecalis* and 54 *E. faecium* isolates from turkeys and 120 *E. faecalis* and 63 *E. faecium* from chicken broilers, for a total of 387 isolates of these two *Enterococcus* species.

Multiresistance phenotypes. Percentages of antimicrobial-resistant isolates based on MICs for both *E. faecalis* (n = 270) and *E. faecium* (n = 117) from chickens and turkeys are presented in Tables 1 and 2, respectively. Although all isolates were resistant to three or more antimicrobials, all were susceptible to VAN and LIZ. Low, intermediate, and high frequencies of antimicrobial resistance were observed in the *E. faecalis* and *E. faecium* isolates tested in relation for specific antimicrobials. Most of the isolates of *E. faecalis* and *E. faecium*, respectively, were resistant to BAC (88.1 and 94%), ERY (72.6 and 80.3%), LIN (100 and 94%), QD (98.5 and 89.7%), TET (95.6 and 89.7%), and TYL (73 and 75.2%) but susceptible to CHL (0 and 0.9%). Low to intermediate frequencies of antimicrobial resistance to CIP (0.7 and 14.5%), FLA (3.7 and 41%), GEN (high level; 9.6 and 4.3%), KAN (high level; 25.2 and 17.1%), STR (high level; 46.7 and 38.5%), NIT (2.6 and 20.5%), PEN (3 and 27.4%), and SAL (7 and 12.8%) were observed in both *E. faecalis* and *E. faecium*, respectively. Multidrug resistance to LIN-QD-TET was observed in 94.4% (255) of the *E. faecalis* isolates, and multiresistance to BAC-ERY-LIN-QD-TET-TYL was found in 66.7% (78) of the *E. faecium* isolates. Among *E. faecium* isolates, a wide range of MICs of QD (4 to 32 mg/ml) was observed. Also, a high level of resistance to TET and TYL was observed, with high MICs of these antimicrobials.

Numerous multiresistant phenotypes were observed among both *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from turkeys and chicken broilers (Table 3). *E. faecium* isolates had more multiresistant phenotypic profiles (65 different profiles) than did *E. faecalis* (42 profiles). Five common multiresistant phenotypes were observed in *E. faecalis* isolates: BAC-ERY-LIN-QD-TET-TYL (54 isolates), BAC-LIN-QD-TET (50), BAC-ERY-LIN-

KAN-QD-STR-TET-TYL (36), BAC-ERY-LIN-QD-STR-TET-TYL (25), and ERY-LIN-QD-STR-TET-TYL (23). One predominant multiresistant phenotype was observed in *E. faecium* isolates: BAC-ERY-LIN-QD-TET-TYL (19 isolates). Both of the predominant multiresistance patterns in *E. faecalis* and *E. faecium* included six antimicrobials.

Multiresistance genotypes and Rep-PCR clonality. All *E. faecalis* and *E. faecium* isolates were tested for the presence of *vanA*, *vanB*, and *qacEd1-sul1* genes, and none of these genes were detected. For each species, PCR assay and sequencing were used to examine the genes encoding for antimicrobial resistance in the predominant multiresistant phenotype (Table 4). The *ermB* (MLS_B resistance), *bcrB*, and *tetM* genes were the most commonly observed resistance determinants. Of those isolates positive for *ermB* and *tetM* genes (65 of 73), 18 were positive for the Tn916/Tn1545-like integrase family gene. Eight isolates that were negative for the Tn916/Tn1545-like gene and were *tetM* resistant were positive for the presence of the Tn5397-like (*tdnX*) gene. Isolates that were positive for the Tn916/Tn1545-like integrase family gene were all *tetM* and *ermB* resistant. BAC resistance and TET resistance was not explained in 20 and 1 isolate, respectively. QD resistance was not explained in nine *E. faecium* isolates, which did not have any *vat* genes (36). All other resistance genes conferring resistance to a particular antimicrobial were found in all isolates exhibiting the corresponding phenotype. Each isolate that had the predominant *E. faecium* multiresistant phenotype had different antimicrobial resistance genotypes, whereas 12 different antimicrobial resistance genotypes were observed for the predominant *E. faecalis* phenotype (Table 4). Of these isolates, those originating from the same pool (cecal contents of approximately 10 birds) were characterized using Rep-PCR to determine their clonality; 50% were clonal with the same antimicrobial resistance genotype. However, 45% were clonal by Rep-PCR but had different antimicrobial resistance genotypes. The remaining isolates were not clonal and had different antimicrobial resistance genes. Thus, in our study, only one representative isolate of each clone with the same antimicrobial resistance gene profile was selected.

Plasmid extraction, hybridization, and transferability. Plasmid extractions and hybridizations revealed that the *tetO* and *ermB* genes were both colocalized on a small plasmid of ca. 11 kb in nine strains of the predominant multiresistant phenotype of *E. faecalis* (Fig. 1). Only two of the nine strains were clonal, as determined by Rep-PCR. Filter mating experiments revealed that three of the strains had the capacity to transfer both genes to a recipient strain.

DISCUSSION

This study gives a better understanding of the multiple antimicrobial resistance profiles observed in *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from the intestinal tract of healthy broiler chickens and turkeys slaughtered in Canada. For the first time, we also provide evidence of plasmid colocalization of *tetO* and *ermB* genes in *E. faecalis* isolates, indicating that antimicrobial coselection and transferability could occur via this single genetic element. *E. faecalis* was the predominant species (69.8% of isolates) recovered from both broiler chicken and turkey samples, in accordance with some reports (29, 31) but in contrast with others indicating *E. faecium* as the most frequent enterococcal species isolated from poultry (34, 37). Both species accounted for a large proportion (74%) of the enterococcal isolates recovered from poultry in this study.

Data on phenotypic antimicrobial resistance grouping revealed that a high number of isolates of *E. faecalis* and *E. faecium* of poultry origin were resistant to different classes of antimicrobials, and the magnitude of resistance to individual antimicrobial classes was high. All *E. faecalis* and *E. faecium* isolates tested were resistant to three or more antimicrobials, and numerous multiresistance phenotypes were found in both species. The percentage of resistant isolates was generally significant, either higher or occasionally comparable to resistance previously reported for enterococci recovered from poultry operations or retail meat (2, 28, 33). Overall, the antimicrobial resistance we observed among our poultry enterococcal isolates is reflective of local farming practices and the commercially available antimicrobials that are favored in Canada (5), with some differences.

The absence of VAN resistance among enterococcal isolates from broiler chickens and turkeys is consistent with previous observations from the United States (12) because avoparcin has never been approved in North America. However, VAN resistance has been previously reported in poultry enterococcal isolates from European countries (1, 2, 16), where this type of resistance was linked to the use of avoparcin as a growth promoter.

Although a large proportion of isolates was susceptible to GEN, KAN, and STR, high-level resistance to aminoglycosides was detected in a significant percentage of isolates, in accordance with previous reports (25, 28, 37, 40). In our study, prevalence of high-level resistance to STR was much higher than high-level resistance to GEN and KAN. PEN resistance was lower than resistance to STR, although PEN is reported as commonly used in Canadian poultry production both alone and in combination with STR (5). GEN also is used in chickens and turkeys in North America (25). However, this antimicrobial is less frequently used in Canada because of its long withdrawal period, whereas KAN is not listed for use as an antimicrobial in poultry in Canada (5).

The high occurrence of QD resistance we observed among *E. faecium* isolates could be linked to the use of virginiamycin in Canadian poultry production. This observation is consistent with a previous report from the European Union (3). However, it is in contrast with another report indicating that there was no correlation between use of virginiamycin and the presence of QD-resistant strains of enterococci (24) and with another study in which QD resistance among enterococci from animals remained low despite a long history of virginiamycin usage (36). Virginiamycin and QD are both streptogramin A–B combination antimicrobials, and crossresistance has been described (46). Virginiamycin has been used extensively in agriculture as a growth promoter in many countries, but it was banned in 1998 in the European Union mainly because of concerns about resistance that might compromise streptogramin treatments in humans (3). Debate continues over the contribution of virginiamycin use in animals to QD resistance in bacteria found in humans (36). For *E. faecalis*, the situation appears different, because this bacterium is intrinsically resistant to streptogramin A (27).

Few isolates were resistant to NIT in our study. According to one reference (5), this antimicrobial has not been reported to be used in poultry production in Quebec and has been banned by regulations for sale in food producing animals in Canada. Furaltadone also is not approved for veterinary use in Canada (6). Therefore, NIT resistance cannot be clearly explained. Similar results were observed for NIT resistance in Portugal, which was explained by a recent massive and illicit use of furaltadone by poultry producers in

this country (22). Like NIT, furaltadone is a furane antimicrobial, which may explain cross-resistance to these two compounds. In Canada, furaltadone is on the veterinary new drug list, which was last updated in 2000 (8).

At the molecular level, various combinations of the antimicrobial resistance genes *vatD*, *vatE*, *bcrR*, *bcrA*, *bcrB*, *bcrD*, *ermB*, *msrC*, *linB*, *tetM*, and *tetO* were detected in the genomes of isolates within the two predominant multiresistant phenotypes. Thus, a single multiresistant phenotype can be associated with several combinations of antimicrobial resistance genes in *E. faecalis* and *E. faecium* isolates of poultry origin. This finding is in agreement with that of a previous report indicating that poultry enterococci usually are genetically different, with little clonality (37). No VAN genes were detected, and the QD *vatD* gene was observed in both *E. faecalis* and *E. faecium* isolates. The genes encoding resistance to VAN, GEN, and QD have been found in *E. faecium* isolates from humans and animals (32). However, certain clones are more frequent in humans, whereas other clones predominate in various animals (32). Thus, the risk of transmitting animal antimicrobial-resistant *E. faecium* isolates to humans could be of less importance, and the greater problem is the ability of human *E. faecium* isolates to acquire and transfer antimicrobial resistance genes (32). In contrast, similar clones of VAN- and GEN-resistant *E. faecalis* have been recovered from both animals and humans (32), making the human health hazard represented by animal and meat enterococci more complex.

Rep-PCR was used to address the issue of clonality among the antimicrobial-resistant isolates of the two predominant multiresistant phenotypes originating from the same pool (cecal content of approximately 10 birds). Half of these isolates were clonal, with the same antimicrobial resistance gene profile. However, 45% of them were clonal by Rep-PCR but had different antimicrobial resistance genes. Thus, in our study, evaluation of clonality of multiresistant isolates was best performed using both Rep-PCR and molecular antimicrobial resistance analysis. Otherwise, some antimicrobial resistance genes might have been overlooked.

TET resistance was explained in all isolates except one by the *tetM* and *tetO* genes, which have been frequently reported in broilers (2). TET resistance, encoded by the *tetM* gene, has been associated with conjugative transposons related to the Tn916/Tn1545-like family (4, 23). Another conjugative transposon, Tn5397-like, has recently been found in *E. faecium* isolates from broilers (4). In the present study, 28 and 17% of the *tetM*-positive enterococcal isolates carried specific Tn916/Tn1545-like genes and Tn5397-like transposons, respectively. This observation is consistent with a previous report (14). Other researchers concluded that phenotypic acquired resistance to TET is often present in poultry enterococcal isolates that carry the *ermB* gene (14).

In our study, the *ermB* (MLS_B resistance), *bcrB*, and *tetM* genes were the most commonly observed resistance genes. The *ermB* gene was colocalized with the *tetO* gene on a low-molecular-weight plasmid of ca. 11 kb in nine strains harboring these genes. To our knowledge, this is the first report of these genes on the same low-molecular-weight plasmid. Transferability was obtained in only three of those strains, suggesting a possible nonconjugative plasmid that could need mobilization by a coresident conjugative element (19). TET resistance (*tetM*) and ERY resistance (*ermB*) colocalization on Tn1545 has previously been reported in enterococci (23). Tn1545 encodes for TET (*tetM*), ERY (*ermB*), and KAN (*aph(3')-IIIa*) resistance and has 25.3 kb (13). In our study, the *tetO* and *ermB* probes both hybridized with a ca. 11-kb plasmid in *E. faecalis* isolates, whereas the *tetM* probe did not. In addition, these isolates tested negative for the Tn916/Tn1545-like integrase family gene. Thus, the *tetO* and *ermB* genes identified in this study are not colocated on the Tn1545-like transposon. We are sure that we identified *tetO* and not *tetM* or a hybrid of the two genes because the alignment of the sequences of the PCR product of *tetM* and *tetO* genes using nucleotide BLAST searches (NCBI, Bethesda, MD) resulted in an identity of 76% (47% query coverage). PCRs were performed on one *tetO*-positive and one *tetM*-negative strain with *tetM* primers and, inversely, with *tetO* primers on a strain with only the *tetM* gene; all these PCRs resulted in no amplifications. TETs are not frequently used in poultry operations in Canada because many microorganisms are resistant to these antimicrobials (5). Thus, our results suggest that the use of MLS_B antimicrobials could maintain TET

resistance in poultry flocks via the coselection process. Results of conjugation experiments suggest that these antimicrobial resistances could be transferred to other bacteria via the ca. 11-kb plasmid.

In conclusion, we found no VAN resistance but significant high-level resistance to aminoglycosides and high occurrence of QD resistance among commensal enterococci isolated from poultry in Canada. We also determined that a single multidrug-resistant phenotype can be associated with several combinations of antimicrobial resistance genes. We also demonstrated for the first time the presence of *ermB* and *tetO* resistance genes on a small and transferable ca. 11-kb plasmid in *E. faecalis* isolates of poultry origin.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded partly by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (M. Archambault, RGPIN-191461), the Public Health Agency of Canada, and the Poultry Industry Council of Canada (PIC-237).

REFERENCES

1. Aarestrup, F. M. 2000. Characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* (GRE) from broilers and pigs in Denmark: genetic evidence that persistence of GRE in pig herds is associated with coselection by resistance to macrolides. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2774–2777.
2. Aarestrup, F. M., Y. Agerso, P. Gerner-Smidt, M. Madsen, and L. B. Jensen. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 37:127–137.
3. Aarestrup, F. M., A. M. Seyfarth, H. D. Emborg, K. Pedersen, R. S. Hendriksen, and F. Bager. 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2054–2059.
4. Agerso, Y., A. G. Pedersen, and F. M. Aarestrup. 2006. Identification of Tn5397-like and Tn916-like transposons and diversity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* in enterococci from humans, pigs and poultry. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:832–839.
5. Anonymous. 2010. Bio-Agri-Mix (BAM) total solutions. Compendium of veterinary products. Available at: <http://bam.naccvp.com/?u~country&p~msds>. Accessed November 20th 2010.
6. Anonymous. 2010. List of veterinary drugs not permitted for use in equine slaughtered for food with Canadian brand name examples (10 March 2010). Available at: <http://www.inspection.gc.ca/english/fssa/meavia/man/ch17/annexee.shtml#e5>. Accessed March 25th 2011.
7. Anonymous. 2010. National Antimicrobial Resistance Monitoring System. NARMS animal isolates. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Available at: <https://www.ars.usdagov/Main/docs.htm?docid~6750&page~3>. Accessed August 26th 2010.
8. Anonymous. 2010. Veterinary new drug list. Available at: http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mpps/vet/legislation/guide-ld/vet_drug-drogués_list-eng.php. Accessed March 25th 2011.
9. Arias, C. A., and B. E. Murray. 2008. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* 6:637–655.
10. Arsenault, J., A. Letellier, S. Quessy, V. Normand, and M. Boulianne. 2007. Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. caecal colonization in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. *Prev. Vet. Med.* 81:250–264.
11. Bozdogan, B., L. Berrezouga, M. S. Kuo, D. A. Yurek, K. A. Farley, B. J. Stockman, and R. Leclercq. 1999. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:925–929.
12. Butaye, P., L. A. Devriese, and F. Haesebrouck. 2001. Differences in antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from farm and pet animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1374–1378.
13. Caillaud, F., C. Carlier, and P. Courvalin. 1987. Physical analysis of the conjugative shuttle transposon Tn1545. *Plasmid.* 17:58–60.

14. Cauwerts, K., A. Decostere, E. M. De Graef, F. Haesebrouck, and F. Pasmans. 2007. High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene. *Avian Pathol.* 36:395–399.
15. Cenci Goga, B. T., L. Aquilanti, A. Osimani, D. Miraglia, and F. Aloisio. 2003. Identification with multiplex PCR assay of *Enterococcus* species isolated from dairy products in Umbria, Italy. *Vet. Res. Commun.* 27(Suppl. 1):671–674.
16. Cetinkaya, Y., P. Falk, and C. G. Mayhall. 2000. Vancomycin resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:686–707.
17. Cheng, S., F. K. McCleskey, M. J. Gress, J. M. Petroziello, R. Liu, H. Namdari, K. Beninga, A. Salmen, and V. G. DeVecchio. 1997. A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* 35:1248–1250.
18. Clark, N. C., O. Olsvik, J. M. Swenson, C. A. Spiegel, and F. C. Tenover. 1999. Detection of a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:157–160.
19. Clewell, D. B., M. V. Francia, S. E. Flannagan, and F. Y. An. 2002. Enterococcal plasmid transfer: sex pheromones, transfer origins, relaxases, and the *Staphylococcus aureus* issue. *Plasmid.* 48:193–201.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 3rd ed., vol. 28, no. 8. Approved standard M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, vol. 31, no. 1. 20th informational supplement, approved standard M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
22. da Costa, P. M., M. Oliveira, A. Bica, P. Vaz-Pires, and F. Bernardo. 2007. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolated from poultry feed and feed ingredients. *Vet. Microbiol.* 120:122–131.
23. De Leener, E., A. Martel, A. Decostere, and F. Haesebrouck. 2004. Distribution of the *erm(B)* gene, tetracycline resistance genes, and Tn1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. *Microb. Drug Resist.* 10:341–345.
24. Donabedian, S., L. A. Thal, P. Bozigar, T. Zervos, E. Hershberger, and M. Zervos. 2003. Antimicrobial resistance in swine and chickens fed virginiamycin for growth promotion. *J. Microbiol. Methods* 55:739–743.
25. Donabedian, S. M., L. A. Thal, E. Hershberger, M. B. Perri, J. W. Chow, P. Bartlett, R. Jones, K. Joyce, S. Rossiter, K. Gay, J. Johnson, C. Mackinson, E. Debess, J. Madden, F. Angulo, and M. J. Zervos. 2003. Molecular characterization of gentamicin-resistant enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *J. Clin. Microbiol.* 41:1109–1113.
26. Elsayed, S., N. Hamilton, D. Boyd, and M. Mulvey. 2001. Improved primer design for multiplex PCR analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. *J. Clin. Microbiol.* 39:2367–2368.
27. Emborg, H.-D., P. B. Larsen, O. E. Heuer, V. F. Jensen, A. M. Hammerum, L. Bagger-Skjøt, C. Brandt, N. Frimodt-Møller, and D. L. Monnet. 2004. DANMAP 2004—use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. Danish Integrated Antimicrobial

Resistance Monitoring and Research Programme, Technical University of Denmark, Søborg.

28. Fracalanza, S. A., E. M. Scheidegger, P. F. Santos, P. C. Leite, and L. M. Teixeira. 2007. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102:853–859.
29. Franz, C. M., W. H. Holzapfel, and M. E. Stiles. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* 47:1–24.
30. Giraffa, G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 163–171.
31. Graham, J. P., S. L. Evans, L. B. Price, and E. K. Silbergeld. 2009. Fate of antimicrobial-resistant enterococci and staphylococci and resistance determinants in stored poultry litter. *Environ. Res.* 109:682–689.
32. Hammerum, A. M., C. H. Lester, and O. E. Heuer. 2010. Antimicrobial resistant enterococci in animals and meat: a human health hazard? *Foodborne Pathog. Dis.* 7(10):1137–1146.
33. Hayes, J. R., L. L. English, L. E. Carr, D. D. Wagner, and S. W. Joseph. 2004. Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from commercial poultry production environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6005–6011.
34. Hayes, J. R., L. L. English, P. J. Carter, T. Proescholdt, K. Y. Lee, D. D. Wagner, and D. G. White. 2003. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7153–7160.
35. Hummel, A., W. H. Holzapfel, and C. M. Franz. 2007. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* 30:1–7.
36. Jackson, C. R., P. J. Fedorka-Cray, J. B. Barrett, L. M. Hiott, and T. A. Woodley. 2007. Prevalence of streptogramin resistance in enterococci from animals: identification of *vatD* from animal sources in the USA. *Int. J. Antimicrob. Agents* 30:60–66.
37. Jackson, C. R., P. J. Fedorka-Cray, J. B. Barrett, and S. R. Ladely. 2004. Genetic relatedness of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry carcasses. *Avian Dis.* 48:100–107.
38. Jensen, V. F., and A. M. Hammerum. 2008. DANMAP 2008—Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme, Technical University of Denmark, Søborg.
39. Lester, C. H., N. Frimodt-Møller, and A. M. Hammerum. 2004. Conjugal transfer of aminoglycoside and macrolide resistance between *Enterococcus faecium* isolates in the intestine of streptomycin-treated mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 235:385–391.
40. Lim, S. K., K. Tanimoto, H. Tomita, and Y. Ike. 2006. Pheromone-responsive conjugative vancomycin resistance plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates from humans and chicken feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:6544–6553.
41. Manson, J. M., S. Keis, J. M. Smith, and G. M. Cook. 2004. Acquired bacitracin resistance in *Enterococcus faecalis* is mediated by an ABC transporter and a novel regulatory protein, BcrR. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3743–3748.
42. Maynard, C., J. M. Fairbrother, S. Bekal, F. Sanschagrin, R. C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Larivière, and J. Harel. 2003. Antimicrobial resistance genes

- in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3214–3221.
43. Murray, B. E. 1990. The life and times of the *enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3:46–65.
 44. Murray, B. E. 1998. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg. Infect. Dis.* 4:37–47.
 45. Poeta, P., D. Costa, Y. Saenz, N. Klibi, F. Ruiz-Larrea, J. Rodrigues, and C. Torres. 2005. Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal enterococci of wild animals in Portugal. *J. Vet. Med. B.* 52:396–402.
 46. Simjee, S., L. B. Jensen, S. M. Donabedian, and M. J. Zervos. 2006. *Enterococcus*, p. 315–328. In F. M. Aarestrup (ed.), *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. ASM Press, Washington, DC.
 47. Soltani, M., D. Beighton, J. Philpott-Howard, and N. Woodford. 2000. Mechanisms of resistance to quinupristin-dalfopristin among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in Western Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:433–436.
 48. Swenson, J. M., M. J. Ferraro, D. F. Sahm, N. C. Clark, D. H. Culver, and F. C. Tenover. 1995. Multilaboratory evaluation of screening methods for detection of high-level aminoglycoside resistance in enterococci. National Committee for Clinical Laboratory Standards Study Group on Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 33:3008–3018.
 49. van den Bogaard, A. E., and E. E. Stobberingh. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14:327–335.
 50. Versalovic, J., T. Koeuth, and J. R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19:6823–6831.

TABLE 1. Antimicrobial resistance in *E. faecalis* isolates from turkey and broiler chickens based on MICs^a.

Antimicrobial agent	Number of isolates at an MIC (µg/ml) of :															% resistant isolates
	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
Bacitracin							3	5	24	49	189					88.1
Chloramphenicol					1	163	105	1								0
Ciprofloxacin	2	6	94	159	7	2										0.7
Erythromycin			39	24	10	1	196									72.6
Flavomycin				243	7	4	4	2	10							3.7
Gentamicin											240	4	9	17		9.6
Kanamycin											193	5	4	68		25.2
Lincomycin							1	7	262							100
Linezolid			5	187	78											0
Nitrofurantoin						26	191	18	20	8	7					2.6
Penicillin			6	4	102	146	4	8								3
Salinomycin				122	56	73	18		1							7
Streptomycin													144	7	119	46.7
Quinupristin / dalfopristin					4	9	179	48	30							98.5
Tetracycline						12		6	252							95.6
Tylosin				54	16	3			197							73
Vancomycin			15	194	60	1										0

^a Vertical lines indicate MIC breakpoints; bold numbers are the number of resistant isolates

TABLE 2. Antimicrobial resistance of *E. faecium* isolates from turkey and broiler chickens based on MIC^a.

Antimicrobial agent	Number of isolates at an MIC (µg/ml) of :															% resistant isolates
	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
Bacitracin							3	1	3	3	107					94
Chloramphenicol					6	78	32		1							0.9
Ciprofloxacin	1	3	13	34	49	17										14.5
Erythromycin			5	13	3	2	94									80.3
Flavomycin				28	6	21	9	5	48							41
Gentamicin											111	1			5	4.3
Kanamycin										74	21	2		20		17.1
Lincomycin				7			1	4	105							94
Linezolid			1	72	44											0
Nitrofurantoin						3	22	5	22	41	24					20.5
Penicillin			7	2	21	29	26	32								27.4
Salinomycin				26	24	52	15									12.8
Streptomycin													72	20	25	38.5
Quinupristin / dalfopristin				7	5	13	20	26	46							89.7
Tetracycline						11	1	2	103							89.7
Tylosin				9	16	3	1		88							75.2
Vancomycin			68	29	20											0

^a Vertical lines indicate MIC breakpoints; bold numbers are the number of resistant isolates.

Table 3. Main phenotypic multiresistance profiles observed among *E. faecium* and *E. faecalis* isolates from poultry.

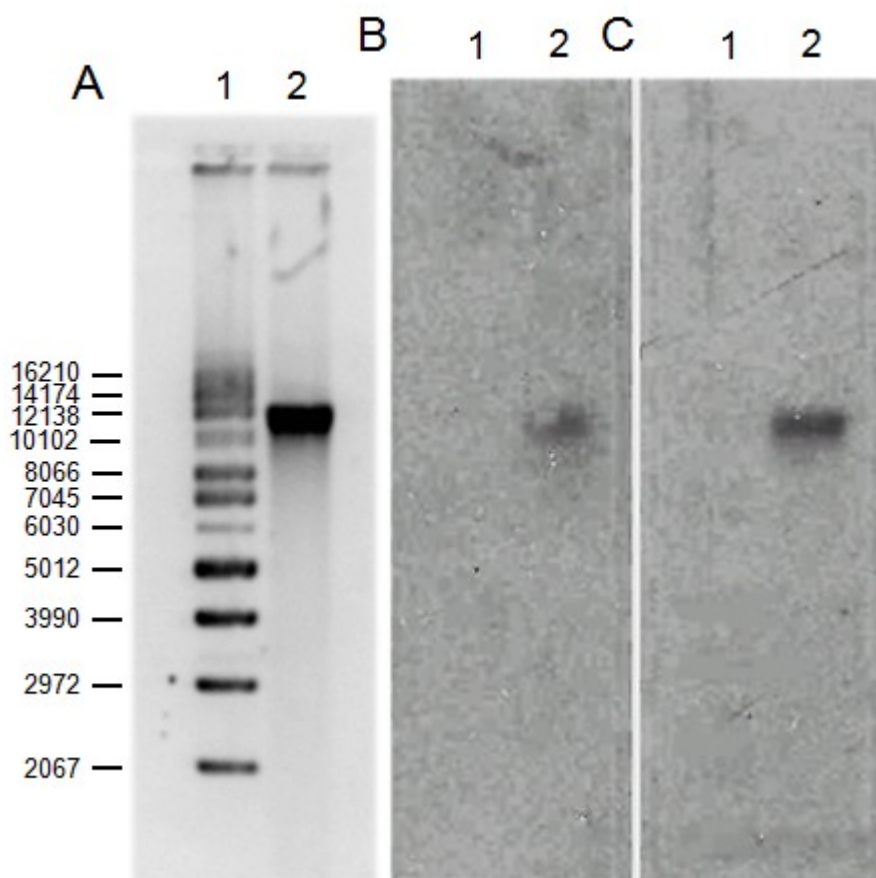
Bacterial species	Phenotypic multiresistant profile ^a	Total no. of isolates
<i>E. faecalis</i>	BAC, LIN, QD, TET	50
	BAC, LIN, STR, QD, TET	8
	BAC, ERY, LIN, QD, TET, TYL	54
	ERY, LIN, STR, QD, TET, TYL	23
	BAC, ERY, LIN, STR, QD, TET, TYL	25
	BAC, ERY, GEN, KAN, LIN, QD, TET, TYL	8
	BAC, ERY, LIN, KAN, STR, QD, TET, TYL	36
	BAC, ERY, LIN, SAL, STR, QD, TET, TYL	7
	BAC, ERY, GEN, KAN, LIN STR, QD, TET, TYL	10
<i>E. faecium</i>	BAC, ERY, PEN	2
	BAC, CIP, FLA, TET	2
	BAC, FLA, LIN, TET	2
	BAC, LIN, QD, TET	2
	BAC, FLA, LIN, QD	2
	BAC, LIN, STR, QD, TET	3
	BAC, ERY, LIN, QD, TET, TYL	19
	BAC, ERY, LIN, NIT, QD, TET	2
	BAC, ERY, LIN, STR, QD, TET, TYL	6
	BAC, ERY, FLA, LIN, QD, TET, TYL	7
	BAC, ERY, FLA, LIN, STR, QD, TET, TYL	3
	BAC, CIP, ERY, FLA, LIN, QD, TET, TYL	2
	BAC, ERY, FLA, LIN, PEN, QD, TET, TYL	3
	BAC, CIP, ERY, LIN, STR, QD, TET, TYL	2
	BAC, ERY, KAN, LIN, STR, QD, TET, TYL	5
	BAC, ERY, FLA, LIN, SAL, QD, TET, TYL	2
	BAC, ERY, LIN, NIT, PEN, STR, QD, TET, TYL	2
	BAC, ERY, FLA, KAN, LIN, STR, QD, TET, TYL	3
	BAC, ERY, KAN, LIN, NIT, PEN, STR, QD, TET, TYL	2

^a BAC, bacitracin; ERY, erythromycin; FLA, flavomycin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; LIN, lincomycin; NIT, nitrofurantoin; PEN; penicillin; QD, quinupristin-dalfopristin; SAL, salinomycin; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TYL, tylosin.

TABLE 4. Genotypic profiles of the predominant multiresistant phenotype (BAC-ERY-LIN-QD-TET-TYL) of *E. faecium* and *E. faecalis* isolates.

Bacterial species	Multiresistant genotypic profile	Total no. of isolates
<i>E. faecalis</i>	<i>ermB, tetM</i>	11
	<i>ermB, tetO</i>	1
	<i>bcrB, ermB</i>	1
	<i>ermB, linB, tetM</i>	1
	<i>bcrB, ermB, tetM</i>	4
	<i>bcrB, ermB, tetO</i>	2
	<i>bcrR, bcrB, ermB, tetM</i>	15
	<i>bcrB, ermB, linB, tetM</i>	1
	<i>bcrR, bcrB, ermB, vatD, tetM</i>	3
	<i>bcrR, bcrB, ermB, tetM, tetO</i>	2
	<i>bcrR, bcrA, bcrB, ermB, vatD, tetM</i>	1
	<i>bcrR, bcrA, bcrB, ermB vatD, tetO</i>	2
<i>E. faecium</i>	<i>bcrB, ermB, tetM</i>	1
	<i>ermB, msrC, tetM</i>	1
	<i>bcrA, bcrB, ermB, tetM</i>	1
	<i>bcrB, ermB, linB, tetM</i>	1
	<i>vatE, ermB, msrC, tetM</i>	1
	<i>vatE, bcrR, bcrB, ermB, tetM</i>	1
	<i>vatE, bcrA, bcrB, ermB, tetM</i>	1
	<i>bcrR, bcrA, bcrB, ermB, tetM</i>	1
	<i>vatE, bcrR, bcrA, bcrB, ermB, tetM</i>	1
	<i>vatE, bcrR, bcrB, ermB, linB, tetM</i>	1
	<i>vatD, bcrA, bcrB, ermB, msrC, tetM</i>	1
	<i>vatE, bcrB, ermB, msrC, linB, tetM</i>	1
	<i>bcrA, bcrB, ermB, msrC, linB, tetM</i>	1
	<i>bcrR, bcrA, bcrB, msrC, linB, tetM</i>	1
	<i>vatE, bcrR, bcrA, bcrB, ermB, linB, tetM</i>	1
	<i>vatE, bcrA, bcrB, ermB, msrC, linB, tetM</i>	1
	<i>bcrR, bcrA, bcrB, bcrD, ermB, msrC, tetM</i>	1
	<i>bcrR, bcrA, bcrB, bcrD, ermB, linB, tetM</i>	1
	<i>vatD, bcrR, bcrA, bcrB, bcrD, ermB, msrC, linB, tetM</i>	1

FIGURE 1. Profiling and hybridization of undigested plasmid DNA of multiresistant *E. faecalis* strain 543. (A) Agarose gel of plasmids. (B) Southern blot of plasmids probed with *ermB*. (C) Southern blot of plasmids probed with *tetO*. Lane 1, molecular size standard (in base pairs); Lane 2, *E. faecalis* strain 543 plasmids. Base pairs are indicated on the left side of the image.



ARTICLE II :

“Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecalis* in Abattoir Pigs and Plasmid Colocalization and Cotranfer of *tet*(M) and *erm*(B) Genes”

Cindy-Love Tremblay¹, Ann Letellier¹, Sylvain Quessy¹, Danielle Daignault², and Marie Archambault^{1*}

¹Swine Infectious Disease Research Center, Department of Pathology and Microbiology, University of Montreal, Faculty of Veterinary Medicine, 3200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Quebec, Canada; ²Public Health Agency of Canada, Laboratory for Foodborne Zoonoses, 3400 Boul. Casavant W., Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada.

* Corresponding author: Marie Archambault, Tel : 450-773-8521, Ext 8679; Fax : 450-778-8108

Publié dans : Journal of Food Protection, 2012. **75**(9): p. 1595-602.

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article : Je suis la première auteure de l'article. J'ai activement participé à la conception expérimentale; J'ai substantiellement effectué la recherche, l'analyse des données et écrit le manuscrit.

Running Head: Antibiotic-Resistant Enterococci in Abattoir Pigs

Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecalis* in Abattoir Pigs and Plasmid Colocalization
and Cotranfer of *tet*(M) and *erm*(B) Genes

Cindy-Love Tremblay^a, Ann Letellier^a, Sylvain Quessy^a, Danielle Daignault^b, and Marie
Archambault^{a*}

Keywords: *Enterococcus faecalis*, pigs, abattoir, antibiotic resistance, plasmid, *tet*(M)
and *erm*(B) genes

^a Swine Infectious Disease Research Center, Department of Pathology and
Microbiology, University of Montreal, Faculty of Veterinary Medicine, 3 200 Sicotte
Street, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Quebec, Canada; ^b Public Health Agency of Canada,
Laboratory for Foodborne Zoonoses, 3400 boul. W., St-Hyacinthe, Québec, Canada;

*Corresponding author: Marie Archambault, Tel: (1) 450-773-8521 ext. 8679;
Fax: (1) 450-778-8108

ABSTRACT

This study was conducted to determine plasmid colocalization and transferability of both *erm*(B) and *tet*(M) genes in *Enterococcus faecalis* isolates from abattoir pigs in Canada. A total of 124 *E. faecalis* isolates from cecal contents of abattoir pigs were examined for antibiotic susceptibility. High percentages of resistance to macrolides and tetracyclines were found. Two predominant multiresistance patterns of *E. faecalis* were examined by PCR and sequencing for the presence of genes encoding antibiotic resistance. Various combinations of antibiotic resistance genes were detected; *erm*(B) and *tet*(M) were the most common genes. Plasmid profiling and hybridization revealed that both genes were colocated on a 9-kb transferable plasmid in six strains with the two predominant multiresistant patterns. Plasmid colocalization and cotransfer of *tet*(M) and *erm*(B) genes in porcine *E. faecalis* isolates indicates that antibiotic coselection and transferability could occur via this single genetic element. To our knowledge, this is the first report on plasmid colocalization and transferability of *erm*(B) and *tet*(M) genes in *E. faecalis* on a mobile genetic element of ~9 kb. Physical linkage between important antibiotic resistance determinants in enterococci is of interest for predicting potential transfer to other bacterial genera.

Enterococci are important nosocomial pathogens with intrinsic resistance to many classes of antibiotics such as cephalosporins, lincomycin, and clindamycin and low-level resistance to aminoglycosides (24, 35). *Enterococcus faecalis* is intrinsically resistant to quinupristin-dalfopristin as a result of the presence of the *lsa* determinant, whose function remains to be explained (40). In addition, enterococci have the capacity to easily acquire and express new resistance genes and can thus tolerate antibiotic selective pressure (38). Antibiotic resistance among enterococci is not restricted to human hospitals. Large amounts of antibiotics are used in animal production for treatment and control of animal diseases. Consequently, the food animal microbial flora frequently carries antibiotic resistance to a range of antibiotics, including those classified as critically important for human therapy (22). Previous studies have revealed that the use of avoparcin and gentamicin for growth promotion and therapy in food animals has led to the emergence of vancomycin- and gentamicin-resistant enterococci in animals and meat (1, 19, 22).

Enterococci usually are found in large numbers in foods of animal origin (21). Contamination of meat commonly occurs during slaughter of the animals, and resistant bacteria can be transmitted to humans through consumption and handling of contaminated food. Glycopeptide-resistant and streptogramin-resistant enterococci ingested by healthy volunteers with food in amounts similar to those present in meat sold in grocery stores can survive gastric passage, can multiply, and can be isolated in the feces for up to 14 days after ingestion (43). Enterococci from food animals can transfer their antibiotic resistance genes, which are located on mobile genetic elements, to human intestinal enterococci (29, 34). Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antibiotic-resistant *E. faecalis* have been recently reviewed (23), and both plasmids and transposons were cited as pivotal in the dissemination and persistence of antibiotic resistance in this species. Intestinal enterococci from animals may be more prone than food enterococci to transfer antibiotic resistance to human strains (46). Thus, the presence of antibiotic resistant enterococci in both animal fecal material and meat products may play a significant role in the dissemination of antibiotic resistance genes.

Despite the importance of mobile genetic elements, we have limited knowledge about the genetic content of specific elements in enterococci (23), and information about the molecular basis of antibiotic resistance in animal enterococci from Canada is scarce. A PCR-based typing method targeting replicon-specific plasmid DNA in enterococci and gram-positive bacteria was developed to determine 19 families of plasmids that are associated with very narrow or broad host ranges (27). Acquired resistance to tetracyclines (TET), which is encoded by the *tet(M)* gene, is often present in enterococci from pigs carrying macrolide (M; erythromycin and tylosin are part of this class) resistance, conferred by the *erm(B)* gene (17). Mobile genetic elements in enterococci that contain both of these genes are usually conjugative transposons with a size range of 25 to 65 kb, such as members of the Tn916/Tn1545-family (23). Recently, we reported on plasmid colocalization and transferability of *erm(B)* and *tet(O)* genes on a ~11-kb plasmid in *E. faecalis* isolates of poultry origin (45). To our knowledge, plasmid colocalization and transferability of *erm(B)* and *tet(M)* genes on a mobile genetic element of ~9 kb have not been described in *E. faecalis*.

The aim of this study was to use abattoir pigs in Canada to characterize *E. faecalis* isolates carrying multiple resistances and study plasmid colocalization and transferability of both *erm(B)* and *tet(M)* genes.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection and bacterial isolation. Samples were collected once each week from three porcine slaughterhouses located in Quebec, Canada, as previously described (39). Pigs were randomly selected in each abattoir, for a total of 289 pigs representing 83 farms, and samples of cecal contents were collected from each animal. The fecal material was collected with a spatula from the cecum, which was incised with a scalpel. Samples were individually packaged in Whirl-Pak bags (Nasco, Modesto, CA) and assigned a unique identification number. The contents of the cecum were inoculated into enterococcosel broth (Fisher Scientific Canada, Nepean, Ontario, Canada) and incubated at 35°C for 24 h. Ten microliters of the mixture was then plated on enterococcosel agar and incubated at 35°C for 24 h. One to three suspected enterococci colonies (black halo) from each sample were randomly selected and subcultured for purity onto blood agar (tryptic soy agar plus 5% sheep blood; BioMérieux, Hazelwood, MO). From the presumptive enterococci colonies ($n=701$), a subset of representative isolates ($n=274$) were randomly selected to represent the 83 farms. These isolates were frozen at -20°C until further analysis.

Identification of *E. faecalis*. The 274 isolates were identified to species by PCR. The species-specific primer set for *ddl faecalis* (D-alanine–D-alanine ligase gene) was used for identification as previously described (8) with minor modifications. DNA extraction was performed with the Chelex 100 (Bio-Rad, Totonto, Ontario, Canada) ebullition method, in which many loopfuls of pure colonies were mixed with 10% Chelex and boiled for 20 min. The supernatant contained the DNA was then used in the PCRs. A 5- μ l aliquot of DNA was added to 2.5 μ l of 10X PCR buffer, 0.2 mM concentrations of the deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 2 mM MgCl₂, 1.25 U of Taq DNA polymerase (GE Healthcare, Baie-D'Urfe, Québec, Canada), and 200 mM concentrations of each primer in a total volume of 25 μ l. DNA amplification reactions were carried out using a Whatman Biometra thermocycler (Montreal Biotech, Kirkland, Québec, Canada) with the following conditions: denaturation for 10 min at 94°C, 30 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 62°C, and 1 min at 72°C, and a final extension of 5 min at 72°C. For visualization of PCR products, 5 μ l of each amplicon was subjected to

electrophoresis in a 1.7% agarose gel, which was stained with ethidium bromide. A TrackIt 100-bp DNA ladder (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) was used as the marker. *E. faecalis* MA-58123 (Laboratoire de sante' publique du Québec, Sainte-Anne-De-Bellevue, Québec, Canada) was used as a positive control. Only one isolate of *E. faecalis* was kept for each cecum.

Antibiotic susceptibility testing. PCR-confirmed isolates of *E. faecalis* were tested for MICs of 17 antibiotics (Table 1) according to the recommended Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (M31-A3 and M100-S20) (11, 12). The broth microdilution method recommended by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) (plates CMV1AGPF) was used with the ARIS Sensititre automatic system (Trek Diagnostic Systems, Cleveland, OH). Antibiotics tested (and their interpretation breakpoints) were as follows: bacitracin (BAC, ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$), chloramphenicol (CHL, ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$), ciprofloxacin (CIP, ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$), daptomycin (DAP, > 4 $\mu\text{g/ml}$), erythromycin (ERY, ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$), flavomycin (FLA, ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$), gentamicin (GEN, > 500 $\mu\text{g/ml}$), kanamycin (KAN, $\geq 1,024$ $\mu\text{g/ml}$), linezolid (LIZ, ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$), nitrofurantoin (NIT, ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$), penicillin (PEN, ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$), streptomycin (STR, $> 1,000$ $\mu\text{g/ml}$), tetracycline (TET, ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$), tylosin (TYL, ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$), and vancomycin (VAN, ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$). Breakpoints from NARMS (4) were used for BAC, FLA, KAN (high level), and TYL. For DAP, only a susceptible breakpoint has been established. *Staphylococcus aureus* ATCC29213 and *E. faecalis* ATCC29212 and ATCC51299 were used as quality controls. Multiresistance was defined as acquired non-susceptibility to at least one agent in three or more antibiotic categories (30).

Detection of antibiotic resistance genes. Detection of antibiotic resistance determinants was performed by the PCR method using primers and conditions previously described (2, 5, 9, 17, 20, 25, 32, 36, 42, 44) with minor modifications. The isolates were examined for the presence of the following genes: *bcrABD* operon and its regulatory gene *bcrR*, which encode for both a bacitracin ABC transporter system and an overproduced undecaprenol kinase; *erm(B)*, which encodes a ribosomal methylase that mediates macrolide resistance; *msr(C)*, which encodes a macrolide efflux pump;

aph(3')-IIIa (O-phosphotransferase), *aadE*, *aadA* (both O-adenyltransferases), and *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (bifunctional enzyme with 2''-phosphorylating and 6'-acetylating activities), which encode for aminoglycoside modifying enzymes; and *tet(M)*, *tet(O)*, and *tet(S)*, which encode for TET-minocycline resistance via a ribosomal protection protein mechanism. The class 1 integron *qacEd1-Sul1* gene was determined as previously described (33). A PCR assay for the detection of the *int* gene was also performed in *tet(M)*-positive isolates to identify the presence of members of the Tn916-Tn1545-like family transposons (17). A 5- μ l aliquot of DNA was added to 2.5 μ l of 10X PCR buffer, 0.2 mM concentrations of dNTPs, 2 mM MgCl₂, 150 mM concentrations of each primer (500 mM for *aadE*, *aadA*, and *msr(C)*), and 1.25 U of Taq DNA polymerase (GE Healthcare) in a total volume of 25 μ l. New primer constructions (5' to 3') were as follows: *bcrR* forward (F) tatagggttctcttgccgct and *bcrR* reverse (R) gttaccctaacaatggagtcg (F: position 3,488, R: position 3,913; GenBank accession no. AY496968), *bcrA* F aatccgtcatgttgtagctgctct and *bcrA* R tattatgcacgagccggagcttct (F: position 2,492, R: position 2,805; GenBank accession no. AY496968), and *msr(C)* F cttaggggttgctcaggaaa and *msr(C)* R aacaaaatcggtcccgata (F: position 195, R: position 392; GenBank accession no. AJ243209). Positive and negative controls from collection of the Faculty of Veterinary Medicine (University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada) were used in all PCRs. The identity of the gene products of at least one randomly selected isolate for each gene was verified by DNA sequencing on an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Concord, Ontario, Canada).

Plasmid extraction and hybridization. Six representative multiresistant isolates of *E. faecalis* harboring *tet(M)* and *erm(B)* genes from the two predominant profiles were selected based on criteria (Table 1) for plasmid extraction and conjugation. Extraction was performed using a Midiprep Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's specifications with a lysis step of 5 mg/ml lysozyme. Plasmid extracts were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel that was run at 110 V for 90 min and then stained with ethidium bromide. Probes for Southern hybridization were generated by substituting digoxigenin-labeled dNTPs (PCR Dig Probe Synthesis Kit, Roche Applied Science, Laval, Québec, Canada) for standard dNTPs in the

amplification reaction according to the manufacturer's instructions. DNA from plasmid extractions was transferred to positively charged nylon membranes with a vacuum blotter (model 785, Bio-Rad) and probed with the digoxigenin-labeled PCR products for the selected antibiotic resistance genes, *erm*(B) and *tet*(M). Prehybridizations and hybridizations were carried out at 70°C for 30 min and 18 h, respectively, in hybridization buffer with subsequent washings, as recommended by the manufacturer. The colorimetric method (nitroblue tetrazolium–5-bromocresyl-3-indolylphosphate substrate solution, Roche Applied Science) was then used to detect the presence of digoxigenin-labeled probes. PCR products were used as hybridization controls, and control digoxigenin-labeled DNA was used as a detection control. Purified DNA from *E. faecalis* JH2-2 (plasmid free) was used as a negative control for *erm*(B) and *tet*(M) genes in a dot blot assay (data not shown). Approximate size of the plasmids was determined using a supercoiled DNA ladder (Invitrogen) as a molecular weight marker.

Plasmid transferability. Filter mating experiments were performed as previously described (28). The six *E. faecalis* isolates harboring *erm*(B) and *tet*(M) genes were used as donors, and *E. faecalis* JH2-2 (*rif*^R, *fus*^R, and *erm*(B) and *tet*(M) negative) was used as the recipient strain. The PCR assay, as described above, was performed to identify both genes in transconjugants. Plasmids from six donors and four transconjugants harboring *tet*(M) and *erm*(B) genes were extracted and hybridized as described above.

PCR for *rep* families and regions upstream of *tet*(M) gene. *Rep* families were investigated because some plasmid families have been associated with a very narrow host range (present in one species) and others have a broader host range (present in more than one species) (27). All donors and transconjugants were screened for *rep*-like sequences by PCR as previously described (27). Sequenced PCR amplification products were used as positive controls for 14 *rep* families: *rep*₁, *rep*₂, *rep*₄, *rep*₆, *rep*₈, *rep*₉, *rep*₁₁, *rep*₁₃, *rep*₁₄, *rep*₁₅, *rep*₁₆, *rep*₁₇, *rep*₁₈, and *rep*_{Unique}. PCR detection and sequencing of the region upstream of the *tet*(M) gene was also performed on one donor and its transconjugant to further characterized the ~9-kb plasmid. A 5-μl aliquot of DNA was added to 1X PCR buffer, 0.2 mM concentrations of dNTPs, 2 mM MgSO₄, 200 mM

concentrations of primer (5'-taattctgtaatcgctccactgtt-3'), and 1 U of Platinum Taq DNA polymerase high fidelity (Invitrogen) in a total volume of 25 μ l. Sequencing was performed as described above.

RESULTS

Bacterial identification. A total of 701 colonies were purified from porcine ceca and identified as enterococci. Of those colonies, 274 randomly selected isolates were presumptively identified as *E. faecalis* by PCR assay. A total of 124 isolates were confirmed as *E. faecalis*.

Antibiotic resistance phenotypes. Percentages of antibiotic resistance based on MICs for *E. faecalis* ($n=124$) from porcine are presented in Table 2. Low, intermediate, and high frequencies of antibiotic resistance were observed in isolates tested with specific antibiotics. Although all isolates were resistant to at least one antibiotic, all were susceptible to VAN, DAP, LIZ, NIT, and PEN. All isolates were resistant to TET, and resistance to M-TET was observed in 81.4% of isolates. A high level of resistance to TET and TYL (expressed as high MICs) also was observed. Numerous resistance phenotypes were noted in the *E. faecalis* isolates from swine ($n=23$) (Table 3). The four following patterns were predominant: BAC-M-TET ($n=30$), BAC-M-KAN-STR-TET ($n=18$), M-TET ($n=15$), and BAC-TET ($n=11$).

Antibiotic resistance genotypes. The two predominant multiresistant phenotypes were selected for evaluation by PCR and sequencing to examine the genes encoding antibiotic resistance (Table 4). The *erm*(B) and *tet*(M) genes were the most commonly observed resistance determinants in the phenotypic profile BAC-M-TET, and *erm*(B), *tet*(M), *aadE*, and *aph*(3')-IIIa were the most commonly observed resistance genes in the BAC-M-KAN-STR-TET phenotypic profile. Among the 30 isolates harboring the predominant multiresistant phenotype BAC-M-TET, four antibiotic resistance genotypes were observed (Table 4). Six different antibiotic resistance genotypes were identified in the 18 isolates with the predominant phenotype BAC-M-KAN-STR-TET. Overall, 10 different antibiotic resistance genotypes were observed. Of the 47 isolates positive for *erm*(B) and *tet*(M) genes, 24 were positive for the Tn916-Tn1545-like integrase family gene. Resistance to BAC, M, STR, and KAN was not explained in 48, 1, 2, and 3 isolates, respectively. All other resistance genes conferring resistance to a particular

antibiotic were found in all isolates exhibiting the corresponding phenotype. The class 1 integron *qacEdI-SuII* gene was not found.

Plasmid extraction, hybridization and transferability. The ~9-kb plasmid carrying *erm*(B) and *tet*(M) genes was first discovered in *E. faecalis* strain 748 (Fig. 1). Among the isolates positive for *erm*(B) and *tet*(M) genes but negative for the Tn916-Tn1545-like integrase family gene, five other strains representing different combinations of antibiotic resistant genes were selected for plasmid extractions based on criteria found in Table 1. In these strains, hybridization results revealed that *tet*(M) and *erm*(B) were both colocalized on a low-molecular-weight plasmid of ~9 kb. Filter mating experiments revealed that four of those strains had the capacity to transfer both genes to a model recipient strain, *E. faecalis* JH2-2. Colocalization and cotransfer of both *tet*(M) and *erm*(B) on genetic elements of the same size range was also demonstrated in those strains and their respective four transconjugants (data not shown).

Rep families and analysis of the region upstream of the *tet*(M) gene. *Rep* families were investigated to further characterize the ~9-kb plasmid host range. Families *rep*₁₁, *rep*₁₅, and *rep*₁₆ were detected in strain 748 and its transconjugant, and *rep*₁ was detected in strain 1153 and its transconjugant. *Rep*₉ was the only plasmid family that was common to all strains and their transconjugants carrying the ~9-kb plasmid. A nonspecific PCR product was obtained using the defined primers for the *rep*₁ plasmid family. The nonspecific replicons from one donor and one transconjugant were sequenced, which revealed 94% identity with regions corresponding to a DNA segment between open reading frames (ORFs) 14 and 15 of Tn916 and Tn916-like transposons found in different *Streptococcus* species (such as GenBank no. FR671418), in *E. faecalis* (GenBank no. EFU09422), and in *Enterococcus faecium* (GenBank no. HM243623). PCR products for the region upstream of the *tet*(M) gene in one donor and one transconjugant were sequenced, which revealed 76% identity with different regions of the Tn916 transposon, mainly the ORF13 protein gene, of different species of streptococci. The same identity was observed with regions of the Tn916-like transposon found in enterococci.

DISCUSSION

In this study, all *E. faecalis* isolates tested were resistant to at least one antibiotic class, and numerous resistant phenotypes were identified. A high level of resistance to individual antibiotic classes also was found. The percentages of resistant isolates were generally significant and higher than or occasionally comparable to those previously reported for enterococci recovered from pig farms and slaughterhouses (2, 16, 31). Various combinations of antibiotic resistance genes were detected in isolates of the two predominant multiresistant phenotypes. Phenotypes conferring resistance to macrolide, tetracycline, kanamycin, and streptomycin were mostly associated with *erm*(B), *tet*(M), *aph*(3')-IIIa, and *aadE*, respectively.

Overall, *erm*(B) and *tet*(M) were the most common resistance genes. Mobile genetic elements have been associated with resistance to macrolide and tetracycline in enterococci (23). In the present study, many *E. faecalis* isolates positive for *erm*(B) and *tet*(M) genes were negative for the Tn916-Tn1545-like integrase family gene. Because these two genes can be colocalized on transposons of this family, isolates negative for this family of genes were selected for further analysis. Another criterion for isolate selection was the presence or absence of the *tdnX* transposase gene of the Tn5397-like transposon because a new composite structure (Tn1116 of ca. 50 kb) has been identified and apparently resulted from the insertion of *erm*(B)-containing DNA, of likely enterococcal origin, into the *tet*(M) gene of the Tn5397-like transposon (6). The six selected *E. faecalis* strains harbored a low-molecular-weight plasmid of ~9 kb with both the *tet*(M) and *erm*(B) genes, indicating that our strains do not harbor this high-molecular-weight composite structure. Also, four of those strains had the capacity to transfer both genes to a model recipient strain *E. faecalis* JH2-2. The *rep₉* family was detected in these strains and their respective transconjugants; thus, we hypothesized that the ~9-kb plasmid is part of the *rep₉* plasmid family. This family has been associated with a narrow host range because it has been reported in only one species (27). However, this range characterization is dubious because the *rep₉* family usually contains pheromone-responsive plasmids in which the lowest molecular weight plasmid observed has been 36.7 kb (pAM373) (15). Thus, the association between the ~9-kb plasmid of

the present study and the rep family of plasmids requires further investigation. Known genetic elements having *tet*(M) and *erm*(B) genes are usually 25 to 65 kb (23). Colocalization of both genes was observed in a *Streptococcus pyogenes* strain on DNA elements ranging from 21 to more than 50 kb (6). To our knowledge, the present article is the first report of *tet*(M) and *erm*(B) genes on the same low-molecular-weight plasmid of ~9 kb in *E. faecalis*.

In a recent study, an association was found between plasmid size and mobility (41). Classification of plasmids in terms of mobility revealed that conjugative plasmids distribute around an average of 100 kb, whereas mobilizable plasmids have a mean peak at 5 kb and a broad, flat secondary peak at around 150 kb. The smallest putatively conjugative plasmid found in proteobacteria was 21.8 kb (pCRY from *Yersinia pestis*). This plasmid was highly homologous to conjugative plasmids. Thus, the small size of the plasmid in the present study suggests that it may be non-conjugative and would need mobilization by a coresident conjugative element (10). In a previous study, a plasmid of 8 kb (pSES20) isolated from a *Staphylococcus lentus* strain, harbored part of a Tn917-like transposon that included the left terminal repeat, a gene almost identical to *erm*(B), and its regulatory region in addition to the internal direct repeat (47). In our study, the nonspecific replicons from one donor and one transconjugant resulted in 94% identity with regions from the Tn916 and Tn916-like transposons found in streptococci and enterococci, respectively. A PCR product of the region upstream of the *tet*(M) gene was 76% identical to different regions of the Tn916 transposon of streptococci and regions of the Tn916-like transposon of enterococci. Therefore, it is tempting to speculate that the ~9-kb plasmid found in the present study is composed of parts of other elements, such as the Tn916 or Tn916-like transposons. The possibility of dissemination through the food chain of this low-molecular-weight plasmid associated with macrolide and tetracycline resistance in enterococci is of concern and may add to the burden of already widespread genetic elements related to Tn916-Tn1545, Tn5397, CW459TetM/Tn5801, and CTn6000 among enterococci from different sources (23). The use of macrolide antibiotics could maintain tetracycline-resistant microorganisms in porcine operations via the coselection process and vice versa.

Although a large proportion of isolates were susceptible to gentamicin, kanamycin, and streptomycin, high-level resistance to aminoglycosides was detected in a significant percentage of isolates, in accordance with previous reports (19, 26). The prevalence of high-level resistance to kanamycin and streptomycin was much higher than high-level resistance to gentamicin. Because aminoglycosides are antibiotics of choice for treating enterococcal infections, in combination with cell wall inhibiting antibiotics (14), the possibility of dissemination through the food chain of genes conferring a high level of resistance to aminoglycosides in enterococci is of much concern. Streptomycin has been used in combination with penicillin in drinking water in Canadian pork production facilities (3). Gentamicin is used for pigs in the United States (19). However, this antibiotic is voluntarily used less frequently in Canada because of the long withdrawal period required. Kanamycin is not listed for use as an antibiotic in pigs in Canada (3). The broad-spectrum bifunctional enzyme AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia can modify all 2-deoxystreptamine aminoglycosides, such as gentamicin, tobramycin, amikacin, and kanamycin (13), and the *aph(3')-IIIa* gene, which is most commonly associated with high-level kanamycin resistance, was the most prevalent in the present and other studies (2). Acquired bacitracin resistance in *E. faecalis* can be mediated by an ABC transporter (BcrAB) and a novel regulatory protein, BcrR (32). *BcrR* and *bcrB* were the only bacitracin resistance genes detected in the present study. In most bacitracin-resistant isolates, no *bcr* genes were found. Our results likely suggest the presence of other bacitracin resistance mechanisms. As expected, vancomycin resistance was not found which is consistent with previous findings in the United States (7, 37) because avoparcin has not been approved for use in North America. However, dissemination of vancomycin-resistant *E. faecium* strains among pigs has recently been reported in three Michigan counties (18).

Our data provide further evidence of the frequent occurrence of antibiotic-resistant enterococci in abattoir pigs. Vancomycin-resistant *E. faecalis* isolates were not found, but a significant percentage of *E. faecalis* isolates had a high level of resistance to aminoglycosides. For the first time, we provide evidence of a new plasmid associated

with colocalization and cotransfer of *tet*(M) and *erm*(B) genes in porcine *E. faecalis* isolates, indicating that antibiotic coselection and transferability could occur via this single genetic element. Results of this study indicate that enterococcal strains in healthy pigs at slaughter could be a reservoir for aminoglycosides (high-level), tetracycline, and macrolide resistance genes.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded partly by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (M. Archambault, RGPIN-191461), the Public Health Agency of Canada (in kind), and the Fédération des Producteurs de Porcs du Québec. We thank Geneviève Pelletier-Jacques for her technical assistance.

REFERENCES

1. Aarestrup, F. M. 2000. Characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* (GRE) from broilers and pigs in Denmark: genetic evidence that persistence of GRE in pig herds is associated with coselection by resistance to macrolides. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2774–2777.
2. Aarestrup, F. M., Y. Agerso, P. Gerner-Smidt, M. Madsen, and L. B. Jensen. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 37:127–137.
3. Anonymous. 2010. Bio-Agri-Mix (BAM) total solutions, compendium of veterinary products. Available at: <http://bam.naccvp.com/?u~country&p~msds>. Accessed 20 November 2010.
4. Anonymous. 2010. National Antimicrobial Resistance Monitoring System. NARMS animal isolates. Available at: <https://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid~6750&page~3>. Accessed 26 August 2010.
5. Bozdogan, B., L. Berrezouga, M. S. Kuo, D. A. Yurek, K. A. Farley, B. J. Stockman, and R. Leclercq. 1999. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:925–929.
6. Brenciani, A., A. Bacciaglia, M. Vecchi, L. A. Vitali, P. E. Varaldo, and E. Giovanetti. 2007. Genetic elements carrying *erm*(B) in *Streptococcus pyogenes* and association with *tet*(M) tetracycline resistance gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:1209–1216.
7. Butaye, P., L. A. Devriese, and F. Haesebrouck. 2001. Differences in antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from farm and pet animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1374–1378.
8. Cenci Goga, B. T., L. Aquilanti, A. Osimani, D. Miraglia, and F. Aloisio. 2003. Identification with multiplex PCR assay of *Enterococcus* species isolated from dairy products in Umbria, Italy. *Vet. Res. Commun.* 27(Suppl. 1):671–674.
9. Clark, N. C., O. Olsvik, J. M. Swenson, C. A. Spiegel, and F. C. Tenover. 1999. Detection of a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:157–160.
10. Clewell, D. B., M. V. Francia, S. E. Flannagan, and F. Y. An. 2002. Enterococcal plasmid transfer: sex pheromones, transfer origins, relaxases, and the *Staphylococcus aureus* issue. *Plasmid* 48:193–201.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. 3rd ed. M31-A3, vol. 28, no. 8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved standard. 20th informational supplement. M100-S20, vol. 31, no. 1. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

13. Daigle, D. M., D. W. Hughes, and G. D. Wright. 1999. Prodigious substrate specificity of AAC(6')-APH(2''), an aminoglycoside antibiotic resistance determinant in enterococci and staphylococci. *Chem. Biol.* 6:99–110.
14. Davies, J., and G. D. Wright. 1997. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol.* 5:234–240.
15. De Boever, E. H., D. B. Clewell, and C. M. Fraser. 2000. *Enterococcus faecalis* conjugative plasmid pAM373: complete nucleotide sequence and genetic analyses of sex pheromone response. *Mol. Microbiol.* 37:1327–1341.
16. de Jong, A., R. Bywater, P. Butty, E. Deroover, K. Godinho, U. Klein, H. Marion, S. Simjee, K. Smets, V. Thomas, M. Valle, and A. Wheadon. 2009. A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 63:733–744.
17. De Leener, E., A. Martel, A. Decostere, and F. Haesebrouck. 2004. Distribution of the *erm*(B) gene, tetracycline resistance genes, and Tn1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. *Microb. Drug Resist.* 10:341–345.
18. Donabedian, S. M., M. B. Perri, N. Abdujamilova, M. J. Gordoncillo, A. Naqvi, K. C. Reyes, M. J. Zervos, and P. Bartlett. 2010. Characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from swine in three Michigan counties. *J. Clin. Microbiol.* 48:4156–4160.
19. Donabedian, S. M., L. A. Thal, E. Hershberger, M. B. Perri, J. W. Chow, P. Bartlett, R. Jones, K. Joyce, S. Rossiter, K. Gay, J. Johnson, C. Mackinson, E. Debess, J. Madden, F. Angulo, and M. J. Zervos. 2003. Molecular characterization of gentamicin-resistant enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *J. Clin. Microbiol.* 41:1109–1113.
20. Elsayed, S., N. Hamilton, D. Boyd, and M. Mulvey. 2001. Improved primer design for multiplex PCR analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. *J. Clin. Microbiol.* 39:2367–2368.
21. Giraffa, G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 163–171.
22. Hammerum, A. M., C. H. Lester, and O. E. Heuer. 2010. Antimicrobial-resistant enterococci in animals and meat: a human health hazard? *Foodborne Pathog. Dis.* 7:1137–1146.
23. Hegstad, K., T. Mikalsen, T. M. Coque, G. Werner, and A. Sundsfjord. 2010. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:541–554.
24. Hidron, A. I., J. R. Edwards, J. Patel, T. C. Horan, D.M. Sievert, D. A. Pollock, and S. K. Fridkin. 2008. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 29:996–1011.
25. Hummel, A., W. H. Holzapfel, and C. M. Franz. 2007. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* 30:1–7.

26. Jackson, C. R., P. J. Fedorka-Cray, J. B. Barrett, and S. R. Ladely. 2005. High-level aminoglycoside resistant enterococci isolated from swine. *Epidemiol. Infect.* 133:367–371.
27. Jensen, L. B., L. Garcia-Migura, A. J. Valenzuela, M. Lohr, H. Hasman, and F. M. Aarestrup. 2010. A classification system for plasmids from enterococci and other gram-positive bacteria. *J. Microbiol. Methods* 80:25–43.
28. Lester, C. H., N. Frimodt-Moller, and A. M. Hammerum. 2004. Conjugal transfer of aminoglycoside and macrolide resistance between *Enterococcus faecium* isolates in the intestine of streptomycin-treated mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 235:385–391.
29. Lester, C. H., N. Frimodt-Moller, T. L. Sorensen, D. L. Monnet, and A. M. Hammerum. 2006. In vivo transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:596–599.
30. Magiorakos, A. P., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber, and D. L. Monnet. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:268–281.
31. Mangalappalli-Illathu, A., P. Duriez, L. Masson, M. S. Diarra, A. Scott, Y. C. Tien, Y. Zhang, and E. Topp. 2010. Dynamics of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* during swine manure storage. *Can. J. Microbiol.* 56:683–691.
32. Manson, J. M., S. Keis, J. M. Smith, and G. M. Cook. 2004. Acquired bacitracin resistance in *Enterococcus faecalis* is mediated by an ABC transporter and a novel regulatory protein, BcrR. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3743–3748.
33. Maynard, C., J. M. Fairbrother, S. Bekal, F. Sanschagrin, R. C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Lariviere, and J. Harel. 2003. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3214–3221.
34. Moubareck, C., N. Bourgeois, P. Courvalin, and F. Doucet-Populaire. 2003. Multiple antibiotic resistance gene transfer from animal to human enterococci in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2993–2996.
35. Murray, B. E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3:46–65.
36. Poeta, P., D. Costa, Y. Saenz, N. Klibi, F. Ruiz-Larrea, J. Rodrigues, and C. Torres. 2005. Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal enterococci of wild animals in Portugal. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52:396–402.
37. Poole, T. L., M. E. Hume, L. D. Campbell, H. M. Scott, W. Q. Alali, and R. B. Harvey. 2005. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from community wastewater from a semiclosed agri-food system in Texas. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4382–4385.
38. Rice, L. B. 2001. Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerg. Infect. Dis.* 7:183–187.

39. Simard, G. 2008. Caractérisation du risque associé au virus de l'hépatite E chez le porc. M.S. thesis. Université de Montréal, Saint-Hyacinthe.
40. Singh, K. V., and B. E. Murray. 2005. Differences in the *Enterococcus faecalis* *Lsa* locus that influence susceptibility to quinupristin-dalfopristin and clindamycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:32–39.
41. Smillie, C., M. P. Garcillan-Barcia, M. V. Francia, E. P. Rocha, and F. de la Cruz. 2010. Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74:434–452.
42. Soltani, M., D. Beighton, J. Philpott-Howard, and N. Woodford. 2000. Mechanisms of resistance to quinupristin-dalfopristin among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in western Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:433–436.
43. Sorensen, T. L., M. Blom, D. L. Monnet, N. Frimodt-Moller, R. L. Poulsen, and F. Espersen. 2001. Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic-resistant *Enterococcus faecium* from chicken and pork. *N. Engl. J. Med.* 345:1161–1166.
44. Swenson, J. M., M. J. Ferraro, D. F. Sahm, N. C. Clark, D. H. Culver, and F. C. Tenover. 1995. Multilaboratory evaluation of screening methods for detection of high-level aminoglycoside resistance in enterococci. National Committee for Clinical Laboratory Standards Study Group on Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 33:3008–3018.
45. Tremblay, C. L., A. Letellier, S. Quessy, M. Boulianne, D. Daignault, and M. Archambault. 2011. Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from cecal contents in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Canada and plasmid colocalization of *tetO* and *ermB* genes. *J. Food Prot.* 74:1639–1648.
46. Vignaroli, C., G. Zandri, L. Aquilanti, S. Pasquaroli, and F. Biavasco. 2011. Multidrug-resistant enterococci in animal meat and faeces and co-transfer of resistance from an *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. *Curr. Microbiol.* 62:1438–1447.
47. Werckenthin, C., S. Schwarz, and K. Dyke. 1996. Macrolidelincosamide-streptogramin B resistance in *Staphylococcus lentus* results from the integration of part of a transposon into a small plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2224–2225.

Table 1. Selection criteria of the six representative multiresistant isolates of *E. faecalis* harbouring *tet*(M) and *erm*(B) genes from the two predominant profiles for plasmid extraction and conjugation.

Antimicrobial resistance phenotype	Strain number	Antimicrobial resistance genotype	Transposons	
			Tn916/Tn1545 (<i>int</i> gene)	Tn5397-like (<i>tdnX</i> gene)
BAC-M-KAN-STR-TET	817	<i>bcrR</i> , <i>bcrB</i> , <i>erm</i> (B), <i>aph</i> (3')-IIIa, <i>linB</i> , <i>aadE</i> , <i>tet</i> (M)	-	-
	1008	<i>erm</i> (B), <i>aph</i> (3')-IIIa, <i>linB</i> , <i>aadE</i> , <i>tet</i> (M)	-	-
	1153	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (M)	-	+
BAC-M-TET	729	<i>bcrR</i> , <i>bcrB</i> , <i>erm</i> (B), <i>tet</i> (M)	-	-
	748	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (M)	-	+
	1252	<i>erm</i> (B), <i>msrC</i> , <i>tet</i> (M)	-	-

Table 2. Antibiotic resistance in *E. faecalis* isolates from pigs based on MICs.

Antibiotic agent	Number of isolates at an MIC ($\mu\text{g/ml}$) of ^a :																% resistant isolates
	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	
Bacitracin							2	7	26	57	19	13					63.7
Chloramphenicol						4	105	2	7	6							10.5
Ciprofloxacin			1	67	55		1										0.8
Daptomycin			8	91	25												0
Erythromycin			4	15	4			101									81.5
Flavomycin				121						3							2.4
Gentamicin											109	1	2	5	7		11.3
Kanamycin											81		1		42		33.9
Linezolid				4	120												0
Nitrofurantoin							94	20	2	8							0
Penicillin					14	105	5										0
Streptomycin													65	3	15	41	47.6
Tetracycline								6	8	110							100
Tylosin				15	8					101							81.5
Vancomycin			3	93	26	2											0

^anumber of isolates; |, MIC breakpoint; bold numbers, number of resistant isolates; ||, susceptible breakpoint; unshaded areas, range of dilutions tested; numbers in the shaded area, isolates with MICs greater than the highest tested concentrations.

Table 3. Phenotypic resistance profiles observed among *E. faecalis* isolates from pigs.

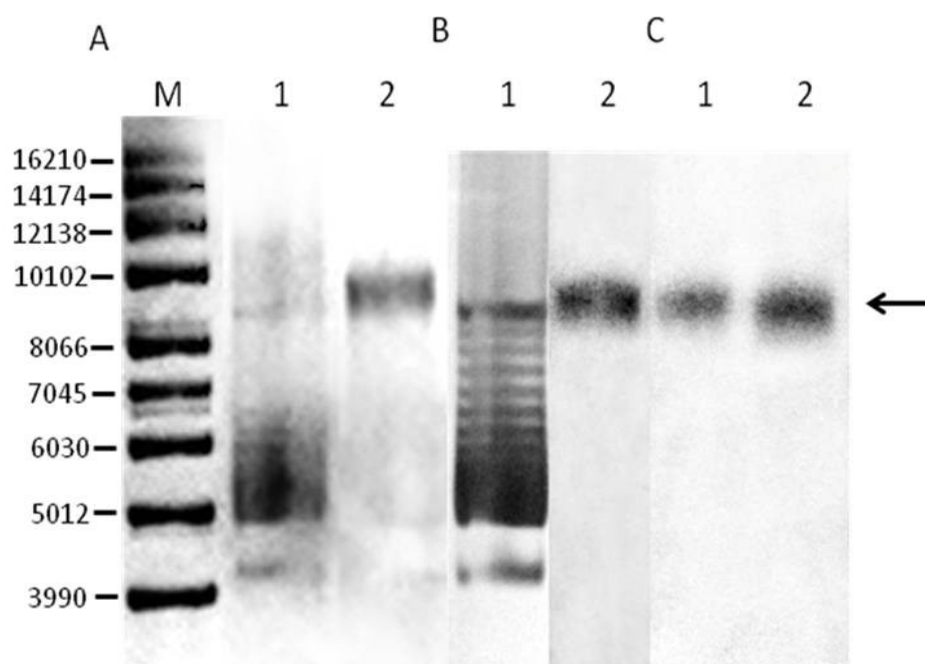
Total no. of isolates	Phenotypic resistance profile^a
30	BAC, M, TET
18	BAC, M, KAN, STR, TET
15	M, TET
11	BAC, TET
7	BAC, M, STR, TET
6	M, STR, TET
5	BAC, CHL, M, KAN, STR, TET
4	M, GEN, KAN, STR, TET
4	BAC, M, GEN, KAN, STR, TET
3	STR, TET
3	BAC, STR, TET
3	BAC, CHL, TET
3	M, KAN, STR, TET
2	TET
2	BAC, CHL, M, GEN, KAN, STR, TET
1	M, FLA, LIN, TET
1	BAC, GEN, KAN, STR, TET
1	BAC, M, FLA, TET
1	BAC, CHL, M, KAN, TET
1	BAC, M, GEN, KAN, TET
1	BAC, M, FLA, KAN, STR, TET
1	CHL, M, GEN, KAN, STR, TET
1	BAC, CHL, M, CIP, GEN, KAN, STR, TET

^a BAC, bacitracin; CIP, ciprofloxacin; M, macrolide; FLA, flavomycin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; CHL, chloramphenicol; PEN, penicillin; STR, streptomycin; TET, tetracycline.

Table 4. Genotypic profiles of the two predominant multiresistant phenotypes of *E. faecalis* isolates.

Predominant multiresistant phenotype	Total no. of isolates	Multiresistant genotypic profile
BAC-M-KAN- STR- TET	13	<i>erm</i> (B), <i>aph</i> (3')-IIIa, <i>aadE</i> , <i>tet</i> (M)
	1	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (M)
	1	<i>erm</i> (B), <i>aadE</i> , <i>tet</i> (M)
	1	<i>bcrR</i> , <i>bcrB</i> , <i>erm</i> (B), <i>tet</i> (M)
	1	<i>bcrR</i> , <i>erm</i> (B), <i>aph</i> (3')-IIIa, <i>aadE</i> , <i>tet</i> (M)
	1	<i>bcrR</i> , <i>bcrB</i> , <i>erm</i> (B), <i>aph</i> (3')-IIIa, <i>aadE</i> , <i>tet</i> (M)
BAC-M-TET	19	<i>erm</i> (B), <i>tet</i> (M)
	5	<i>erm</i> (B), <i>msr</i> (C), <i>tet</i> (M)
	5	<i>bcrR</i> , <i>bcrB</i> , <i>erm</i> (B), <i>tet</i> (M)
	1	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O)

Figure 1. Profiling and hybridization of undigested plasmid DNA of the multiresistant *E. faecalis* strain 748 and one of its transconjugant. Agarose gel of *E. faecalis* strain 748 and transconjugant plasmids (A). Southern blot of plasmids probed with *erm*(B) (B). Southern blot of plasmids probed with *tet*(M) (C). Lane M, a supercoiled DNA ladder (in base pairs, Invitrogen) was used as a molecular weight marker; Lane 1, *E. faecalis* strain 748 plasmids; Lane 2, transconjugant plasmids. Base pairs are indicated on the left side of the image. The black arrow indicates the ~ 9 kb plasmid.



ARTICLE III :

**“Interference in Pheromone-Responsive
Conjugation of a High-Level Bacitracin Resistant
Enterococcus faecalis Plasmid of Poultry Origin”**

Cindy-Love Tremblay¹, and Marie Archambault^{1*}

¹ University of Montreal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology and Microbiology, GREMIP research group, 3 200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Quebec, Canada.

* Corresponding author: Marie Archambault, Tel : 450-773-8521, Ext 8679; Fax : 450-778-8108.

Soumission prochaine dans “International Journal of Environmental Research and Public Health, Special Issue : Antimicrobial Resistance Prevention and Control”

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article : Je suis la première auteure de l'article. J'ai activement participé à la conception expérimentale; J'ai substantiellement effectué la recherche, l'analyse des données et écrit le manuscrit.

RUNNING HEAD: **Interference in bacitracin pheromone conjugation**

Interference in pheromone-responsive conjugation of a high-level bacitracin resistant *Enterococcus faecalis* plasmid of poultry origin

C.L. Tremblay[‡] and M. Archambault[‡]¹

[‡]University of Montreal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology and Microbiology, GREMIP research group, 3 200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Quebec, Canada

¹Corresponding author: Marie Archambault, Tel: (1) 450-773-8521 ext 8679;
Fax: (1) 450-778-8108

Key words: *Enterococcus faecalis*, pheromone-responsive conjugation, plasmid, bacitracin resistance genes, antiserum AS

ABSTRACT

The current study reports on contact interference of a high-level bacitracin resistant pheromone-responsive plasmid of *E. faecalis* strain 543 of poultry origin during conjugative transfer of *bcr* antimicrobial resistance genes using a polyclonal antiserum aggregation substance (AS). After induction with pheromones produced by the recipient strain *E. faecalis* JH2-2, clumping of the donor *E. faecalis* strain 543 was observed as well as high transfer frequencies in short time broth mating. Filter mating assays from donor strain *E. faecalis* 543 to the recipient strain *E. faecalis* JH2-2 revealed conjugative transfer of *asaI* (AS), *bcrRAB* and *traB* (negative regulator pheromone response) genes. The presence of these genes in transconjugants was confirmed by PCR, Southern hybridization and sequencing. The *asaI*, *bcrA* and *traB* probes all hybridized on one plasmid band of 115 kb in *E. faecalis* strains 543 and T543-1, demonstrating a colocalization of all genes. A MIC to bacitracin of $> 2\,048\ \mu\text{g/ml}$ was obtained for both strains 543 and T543-1 whereas the recipient strain JH2-2 demonstrated a MIC of $32\ \mu\text{g/ml}$. Sequencing results further confirmed the association of this genetic element to a pheromone-responsive plasmid related to pJM01. More significantly, this study presents the evidence that a polyclonal antiserum AS₄₄₋₅₆₀ can interfere with the horizontal transfer of a pheromone-responsive plasmid encoding high-level bacitracin resistance of a multidrug resistant *E. faecalis* strain. Reducing the pheromone-responsive conjugation of *E. faecalis* is of interest because of its clinical importance in the horizontal transfer of antimicrobial resistance.

INTRODUCTION

Enterococcus faecalis is part of the normal animal and human gut flora. It is also a major cause of nosocomial infections in humans and has been linked to severe extra-intestinal infections in poultry (Fertner et al., 2011). Clinical conditions observed in poultry include pulmonary hypertension syndrome (Tankson et al., 2001), and amyloid arthropathy (Landman et al., 1994) in addition to first week mortality (Gregersen et al., 2010). Also, a study has demonstrated the high potential of a few *E. faecalis* contaminated eggs or embryos to rapidly facilitate the spread of this bacterium to almost all chickens during hatch (Fertner et al., 2011). More recently, it was demonstrated that *E. faecalis* of human and poultry origin shared virulence genes supporting the zoonotic potential of *E. faecalis* (Olsen et al., 2011).

E. faecalis is able to acquire antimicrobial resistance through transfer of plasmids and transposons, chromosomal exchange, or mutation and this presents a significant challenge for therapeutic measures (Coque, 2008). Poultry *E. faecalis* was identified as a possible antimicrobial resistance reservoir for human communities for glycopeptides (vancomycin and avoparcin) antimicrobials in European countries (Aarestrup, 1995). In some cases, the vancomycin resistant enterococci (VRE) were shown to persist in slaughtered poultry many years after the ban on avoparcin (Ghidan et al., 2008). Enterococci transferable genetic elements have a broad host range and can even be transferred to both gram-negative and gram-positive bacteria (Donelli et al., 2004). Thus, *E. faecalis* could also potentially act as a source of antimicrobial resistance genes for important poultry intestinal pathogens.

Conjugation systems involving plasmids and transposons are abundant in enterococci (Donelli et al., 2004). The sex pheromone response system (Dunny et al., 1978), which is highly specific to *E. faecalis*, has been associated with virulence and antimicrobial resistance (Donelli et al., 2004, Wirth, 1994). This system involves the production of sex pheromones by the recipient and the subsequent recognition of these pheromones by the donor. Each pheromone is specific for a particular plasmid or group of related plasmids (Dunny et al., 2001). Two major cell surface proteins are synthesized after induction with the appropriate sex pheromone, an adhesin or aggregation substance (AS), that

enables contact between donor and recipient during conjugation, and the surface exclusion protein which reduces plasmid transfer between the donor cells harbouring the same sex pheromone plasmid (Chung et al., 1995). The AS binds to a receptor on the surface of the recipient cell to form aggregates and to enhance the conjugation process (Olmsted et al., 1991).

An ABC transporter system involved in bacitracin resistance, in addition to an overproduced undecaprenol kinase were described in *E. faecalis* (Manson et al., 2004). These two mechanisms are both plasmid (pJM01 of ca. 72 kb) encoded by the *bcrABD* operon, which in turn is under the control of a regulatory gene, *bcrR*. It was suggested that this plasmid was pheromone-responsive since negative regulator protein associated genes of the pheromone response, *traA* and *traB*, were detected (Dufour et al., 2007). Another pheromone-responsive plasmid of ca. 85 kb, named pTW9, encoding for bacitracin (*bcrABD* operon), vancomycin (*vanA* operon) and MLS resistance genes (*erm(B)* and *erm(C)*) was recently described in *E. faecalis* (accession number AB563188).

Little information is available on contact interference between donor and recipient cells during pheromone-responsive conjugative transfer of plasmids encoding antimicrobial resistance genes. Interference in the pheromone-responsive conjugation was first described by Olmsted et al. (Olmsted et al., 1991) using specific F'ab fragments to the AS, named Asc10, of the pheromone-responsive plasmid pCF10. The presence of F'ab fragments reduced the mating frequency by a factor of about 100 which was also correlated with the inhibition of aggregation (Olmsted et al., 1991). In addition, various transfer levels were observed for different insertion Asc10 mutants, and transfer levels correlated with aggregation ability (Waters and Dunny, 2001). Reducing the pheromone-responsive conjugation of *E. faecalis* is of interest because of its clinical importance in the horizontal transfer of antimicrobial resistance.

The purpose of this study was to report on contact interference of a high-level bacitracin resistant pheromone-responsive plasmid related to pJM01 in an *E. faecalis* strain of poultry origin during conjugative transfer of its *bcr* antimicrobial resistance genes using a polyclonal antiserum AS.

MATERIAL AND METHODS

Bacteria, media and antibiotics

The previously described *E. faecalis* strain 543 (Tremblay et al., 2011) and *E. faecalis* JH2-2 (Jacob and Hobbs, 1974, Quirantes et al., 1995) were used in this study. Briefly, *E. faecalis* strain 543 is positive for the AS gene, *asaI*, resistant to bacitracin, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, kanamycin, nitrofurantoin, streptomycin, tetracycline, and tylosin with the resistance genes *bcrR*, *bcrA*, *bcrB*, *aadE*, *tet(M)*, *tet(O)*, and *erm(B)*. *E. faecalis* JH2-2 is a fusidic acid- and rifampin-resistant strain and a well characterized pheromone-producer (Jacob and Hobbs, 1974, Quirantes et al., 1995). Brain heart infusion broth (BHI) (Oxoid, Thermo Scientific, Nepean, Ontario, Canada), trypticase soy broth and agar (TSB and TSA) (Difco, Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada) and blood agar (TSA plus 5% sheep blood) were used for routine growth. Isolates were maintained in glycerol at -20°C before testing. For the donor and the transconjugants, antibiotics were used at the following concentrations in TSA: fusidic acid, 25 µg/ml; rifampicin, 25 µg/ml; bacitracin, 100 µg/ml; and tetracycline, 10 µg/ml (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada).

PCR, specific primers and DNA sequencing

Detection of the AS gene *asaI* and the bacitracin resistance genes (*bcrR*, *bcrA* and *bcrB*) was performed by PCR with primers and conditions previously described (Manson et al., 2004, Seno et al., 2005) with minor modifications. Briefly, to 5 µl of DNA was added 2.5 µl of 10X PCR Buffer, 0.2 mM of dNTPs, 2 mM of MgCl₂, 200 mM of each primers and 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (GE Healthcare, Québec city, Québec, Canada) in a total volume of 25 µl. New primer constructions (5' to 3') were as follows: *bcrR* forward tatagggttctcttgcgct, *bcrR* reverse gttaccctaacatggagtcg, *bcrA* forward aatccgtcatgttgtagctgctct, and *bcrA* reverse tattatgcacgagccggagcttct. Detection and sequencing of the pheromone shutdown protein associated-gene *traB*, and regions above *bcrB* and beyond *bcrR* were performed by PCR with the following primers (5' to 3'): *traB* forward gtgctgaagacgtgggggctg, *traB* reverse accggcgacagtgcactact, above *bcrB* forward gccgtttcatggcggtgaaa, above *bcrB* reverse accttcaccatttcaaaaaggagg, beyond *bcrR* forward tcctgcgttaagtcttccagtcc, beyond *bcrR* reverse tcctgcacttcacgataactcaggt.

DNA sequencing was performed on an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Concord, Ontario, Canada). Homology searches using BLAST were performed through the NCBI website (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Filter mating

Filter mating experiments were performed as previously described (Clark et al., 1999) with some modifications. *E. faecalis* JH2-2 was used as a recipient strain in mating experiments with the donor *E. faecalis* strain 543. Donor and recipient cultures were mixed in a 1:1 ratio and added on a 0.22 µm-pore-size filter (Fisher Scientific) then placed on a blood agar plate and incubated for 24 h at 37°C. Transconjugants were selected on TSA agar containing the appropriate antimicrobials.

Pheromone induction and aggregation

The detection of aggregation (clumping) was performed as previously described (Donelli et al., 2004) with minor modifications. An overnight culture filtrate of plasmid-free *E. faecalis* JH2-2 was used as the pheromone. Briefly, clumping was evaluated by adding 100 µl of overnight-cultured *E. faecalis* strain 543 to 0.9 ml of pheromone previously diluted (1:2) in fresh BHI broth. The mixtures were incubated at 37°C for 90 min with shaking, mounted on glass slides, and observed by microscopy for clumping (Leica DMI4000 B Inverted Microscope, Meyer Instruments, Houston, TX, USA). Clumping was recorded as the numbers of aggregates per field. Negative controls were prepared by replacing pheromone-containing filtrates with BHI broth.

Pheromone-responsive conjugation experiments

Short mating induced by the pheromone was performed as previously described (Dunny et al., 1978) with minor modifications. After induction, 0.1 ml of the donor *E. faecalis* strain 543 was mixed with 0.1 ml of the recipient strain *E. faecalis* JH2-2 and the mixture was incubated for 20 min at 37°C. Dilutions of the mixture were then plated on selective plates containing the appropriate antimicrobials and incubated 48 h. Transfer rates were calculated as transconjugants/donor ratio. Gene transfer was confirmed by PCR on transconjugants. To evaluate mobile genetic element stability without selective

pressure, broth passages in TSB were performed as previously described (Manson et al., 2004) and genes lost was confirmed by PCR. One transconjugant (T543-1) was selected for further analysis.

Minimum inhibitory concentration (MIC) determination

Antimicrobial susceptibility testing was performed using broth macro-dilution as described by the recommended Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M31-A3) guidelines on the donor strain *E. faecalis* 543 and the transconjugant T543-1 to determine their MIC to bacitracin (Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008).

Production of antiserum and interference in pheromone-responsive conjugation

The *E. faecalis* AS₄₄₋₅₆₀ protein expression, purification and production of antiserum were performed by GenScript Corporation (Piscataway, New Jersey, USA) according to their Basic Polyclonal Antibody Package (Rabbit). Sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot with the purified protein AS₄₄₋₅₆₀ were performed to demonstrate specificity of the polyclonal anti-AS₄₄₋₅₆₀ (GenScript Corporation). Efficacy of the third and fourth immunizations was determined with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (GenScript Corporation). Interference in the conjugation process was performed with the addition of the polyclonal anti-AS₄₄₋₅₆₀ (non-diluted, 1:5, 1:10) to 1 ml of phosphate-buffered saline 1X (PBS) containing donor cells and incubated for 90 min at 37°C. Cells were washed four times with PBS 1X at 4°C to remove non-specific binding and then resuspended in 0.9% saline for mating incubation (20 min, one and two hours). Gene transfer and transfer rates were evaluated as described above. Pre-immune serum (1:10) (GenScript Corporation) and non-induced bacteria were used as negative controls. Pheromone-induced bacteria incubated with PBS 1X without antibodies were used as a positive control. Experiments were performed in triplicates.

DNA Microarrays

Microarrays were performed on donor strain 543, recipient JH2-2 and one of their transconjugates as previously described by Champagne et al. (Champagne et al., 2011).

Labelled DNA was hybridized on an antimicrobial resistance microarray, containing 173 antimicrobial resistance genes, 15 virulence factors and 70 taxonomic probes, developed for *Enterococcus* (Diarra et al., 2010) at the Biotechnology Research Institute in Montreal (BRIM), Canada. The microarray contains also two added oligonucleotides encoding for bacitracin resistance (*bcrA* and *bcrB* genes), respectively. Arrays were analysed using a ScanArray microarray Scanner (model Express, Perkin-Elmer, Fremont, CA, USA) and the Scanarray Express software program version 1.1. Biological and technical replicates were included in the validation process. Oligonucleotides with a signal-to-noise fluorescence ratio above 3 were considered positive.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

The DNA plugs preparation and PFGE were performed as previously described (Matushek et al., 1996, Garcia-Migura et al., 2005). Briefly, a plug slice of 2 to 4 mm wide was suspended in a total volume of 227 µl of the manufacturer's recommended restriction buffer and 20 U of SmaI (New England Biolabs Inc., Mississauga, Ontario, Canada). Digestion mixture was incubated at 25°C for 2 h. The gel was electrophoresed with a CHEF-DRII apparatus (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) for 21 h at 5.8 V/cm with switching times ramped from 1 to 20 seconds. The sizes of the resolved macrorestriction fragments were predicted according to an external size standard (Low Range PFG Marker, New England Biolabs Inc.).

Southern hybridization

PFGE gels were blotted on positively charged membranes using a Vacuum Blotter Model 785 (Bio-Rad). Probes for hybridizations were generated by substituting standard dNTPs with digoxigenin-labelled dNTPs (PCR Dig Probe Synthesis Kit, Applied biosystems, Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) in the amplification reaction according to the manufacturer's instructions. Membranes were then probed with digoxigenin-labelled PCR products for the genes *asaI*, *bcrA* and *traB*. Pre-hybridizations and hybridizations were carried out at 71°C for 30 min and 18 h, respectively, in hybridization buffer with subsequent washings, as recommended by the manufacturer. After post-hybridization washing of membranes, the colorimetric method

(NBT/BCIP substrate solution, Applied Biosystems, Life Technologies) was used to detect the presence of digoxigenin-labelled probes. PCR products were used as hybridization controls and control DNA dig-labelled as detection control. DNA extract from *E. faecalis* JH2-2 was used as a negative control.

SDS-PAGE and Western blotting

Induced and non-induced *E. faecalis* strain 543 cells were collected by centrifugation and extracted using the earlier described lysozyme technique (Galli et al., 1990). Briefly, for Western blot analysis, these extracts were run on SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes. These were then incubated overnight at 4°C in a 1:1000 dilution in blocking buffer (0.5% Tween 20) of the polyclonal anti-AS₄₄₋₅₆₀ antibody. Membranes were washed and incubated with a goat anti-rabbit horseradish peroxidase conjugate (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) for 1 h. Proteins extract from *E. faecalis* JH2-2 and pre-immune sera (1:1000) (GenScript Corporation) were used as negative controls. Detection was performed using tetramethylbenzidine substrate (TMB; Sigma-Aldrich).

Statistical analysis

The fixed effects linear models were used to determine the statistical significance of differences in transfer rates, number of aggregates per field in clumping assays, and pheromone-responsive conjugation experiments with and without antibodies interference. A *t*-test for unequal variances was used when only two conditions were compared. For multiple comparisons between conditions means in linear models, the sequential Bonferroni adjustment procedure was used to determine comparison-wise alpha levels. Statistical analyses were carried out using SAS v. 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA). Differences with *P* values of < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Conjugal transfer and analysis of transconjugants

Filter mating assays from donor strain *E. faecalis* 543 to the recipient strain *E. faecalis* JH2-2 revealed conjugative transfer of *asaI*, *bcrRAB* and *traB*. The presence of these genes within the transconjugants was confirmed by PCR, Southern hybridization and sequencing. The *asaI*, *bcrA* and *traB* probes all hybridized on one band of ca. 115 kb in *E. faecalis* strains 543 and T543-1 (Fig. 1), demonstrating a colocalization of all genes. No hybridization was observed with the recipient strain *E. faecalis* JH2-2 (data not shown). This is indicative of plasmid colocalization of *asaI* and *bcrRAB* genes in T543-1. BLAST analysis of the sequenced *asaI* gene resulted in identities ranging from 91% to 95% toward 14 different AS genes and 11 of those belong to 10 different pheromone-responsive plasmids and one pathogenicity island (accession number AF454824) in *E. faecalis*. Sequencing of the *traB* gene from *E. faecalis* 543 was also analyzed in BLAST and gave an identity of 98% with the *traB* gene from pJM01 of *E. faecalis* AR01/DGVS (Dufour et al., 2007). Furthermore, identities of 69% and 70% were observed with three others *traB* genes from pheromone-responsive plasmids pAD1 (An and Clewell, 1994), pTEF1 (Paulsen et al., 2003), and pTW9 (Accession number AB563188). The bacitracin resistance genes gave identities of 95% for *bcrR*, 83% for *bcrA* and 87% for *bcrB* with the previously described pJM01 (Manson et al., 2004). Regions above *bcrB* and beyond *bcrR* were also examined. Sequence analysis of the region beyond *bcrR* resulted in identities from 94% to 100% to insertion sequence IS1216-like transposase gene from pJM01 and pTW9. The region above *bcrB* corresponded in an identity of 82% with the *bcrD* gene from both pTW9 and pJM01. *E. faecalis* strains 543, JH2-2 and T543-1 were further characterized by microarray and MIC testing to bacitracin. A MIC to bacitracin of >2 048 µg/ml was obtained for both strains 543 and T543-1. The recipient strain JH2-2 had a MIC of 32 µg/ml. Plasmid stability of the donor strain without selective pressure resulted in plasmid curing after nine broth passages. When transferred to the recipient strain, plasmid of T543-1 was then stable as far as 50 passages in broth. Microarray analysis revealed that bacitracin resistance genes *bcrRAB* and MLS_B resistance gene *ermB* (also referred to as *ermAM*) were identified only in the donor strain 543 and one of its transconjugant, T543-1. The tetracycline *tetO* gene was only detected in the donor

strain 543. The recipient strain JH2-2 was negative for all these genes. Taxonomic genes *atpA* (alpha unit of ATP synthase), *ddlfs* (D-Ala: D-Ala ligase) and *pheS* (phenylalanine-tRNA synthetase α chain) and virulence genes *cpd1* (pheromone cPD1 lipoprotein), *cad1* (pheromone cAD1 precursor lipoprotein), *cCF10* (pheromone cCF10 precursor lipoprotein), *agrBfs* (AgrBfs protein of *E. faecalis* involved in gelatinase biosynthesis activating pheromone), *efaAfs* (endocarditis specific antigen of *E. faecalis*) and *gelE* (gelatinase) were also identified by microarray in the donor strain 543, the recipient JH2-2 and T543-1. The sex pheromone gene *cob* (pheromone cOB1 precursor) was only detected in the recipient strain JH2-2 and T543-1. Miroarray data indicates that in addition to *bcrRAB* genes, the *erm(B)* gene was also able to be transferred from the donor to the recipient strain.

Antisera titer and specificity

Antisera titre after the third immunization was 1:152 000 with a S/N (sample/blank) \geq 2.1. Protein purity was estimated at 85% with a Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel and specificity of the polyclonal anti-AS₄₄₋₅₆₀ on the purified protein was confirmed by Western blot (Fig. 2). Detection of the expressed AS protein with the polyclonal anti-AS₄₄₋₅₆₀ was also demonstrated using pheromone induced *E. faecalis* strain 543 (Fig. 3). No reaction with cell surface proteins was observed with the pre-immune sera (Fig. 3).

Interference in the formation of aggregates using anti-AS₄₄₋₅₆₀ antibodies

The capacity of the pheromone-induced *E. faecalis* strain 543 to aggregate as compared to the non-induced strain was demonstrated in clumping assays (data not shown). When mixed with the recipient strain *E. faecalis* JH2-2, the number of aggregates per field was significantly higher after 20 min compared with the non-induced state (Fig. 4a, 4b and 5). A significant reduction in formation of aggregates was observed when the polyclonal anti-AS₄₄₋₅₆₀ was added in the pheromone-responsive conjugation experiments as compared to the induced state (positive control) ($P < 0.0001$) (Fig. 4d and 5). This reduction was still observed after one and two hours of mating assays (data not shown). Aggregation was observed when using the pre-immune serum (Fig. 4c and 5).

Interference in pheromone-responsive conjugation using anti-AS₄₄₋₅₆₀ antibodies

Interference of anti-AS₄₄₋₅₆₀ antibodies in pheromone-responsive conjugation was demonstrated by a reduction in horizontal transfer of *asaI* and *bcr* genes using *E. faecalis* strain 543 as the donor and *E. faecalis* JH2-2 as the recipient strain (Table 1). The transfer rate to *E. faecalis* JH2-2 from the induced state of *E. faecalis* strain 543 was significantly higher compared to the non-induced ($P < 0.0001$), indicating a pheromone-responsive conjugation process. When anti-AS₄₄₋₅₆₀ antibodies (1:10) was added to the above mixtures, the transfer rate was significantly lower as compared to induced-cells without antibodies ($P < 0.0001$). However, transfer rates of uninduced-cells without antibodies ($P = 0.003$) were significantly lower as compared to induced-cells with antibodies (Table 1). Interference of anti-AS₄₄₋₅₆₀ antibodies on plasmid transfer was also tested with two other dilutions (1:5 and non-diluted) and with longer mating time (one and two hours), which yield similar results. No significant differences were observed with the addition of pre-immune serum ($P = 0.19$) meaning that the complement or any other molecules of the pre-immune serum were not able to interfere with the pheromone conjugation.

DISCUSSION

E. faecalis is indigenously capable of acquiring, accumulating, and sharing extrachromosomal elements encoding genes that contribute to pathogenesis and antimicrobial resistance (Palmer et al., 2010). This species has a highly specific and efficient plasmid transfer system called pheromone-responsive which implies the expression of an AS on its surface (Dunny et al., 1978). The AS binds to a receptor on the surface of the recipient cell to form aggregates and to enhance the conjugation process (Olmsted et al., 1991). This system has also been associated to virulence and antimicrobial resistance (Donelli et al., 2004, Wirth, 1994). In the past years, inhibition of self-clumping of *E. faecalis* expressing AS by an anti-N-terminal AS serum has been demonstrated (Hirt et al., 1993). The correlation between the ability to aggregate and plasmid transfer efficiency was observed using insertion mutants of the aggregation protein (Waters and Dunny, 2001). Moreover, a previous study has used monoclonal anti-Asc10 (AS of pCF10) antibodies and polyclonal F'ab anti-Asc10 to demonstrate the interaction between the AS and the binding substance involved in the pheromone-responsive conjugation of pCF10 and its transfer (Olmsted et al., 1991). Interference in the *E. faecalis* pheromone-responsive conjugation with the aim of reducing horizontal transfer of antimicrobial resistance is of interest because of the clinical importance of antimicrobial resistance in enterococci and their capacity to transfer their resistance genes.

The current study further evaluated the *E. faecalis* conjugation pheromone-responsive interference process. It first identified a pheromone-responsive plasmid encoding high-level bacitracin resistance in a previously studied multidrug resistant *E. faecalis* strain 543 (Tremblay et al., 2011). After induction with pheromones produced by the recipient strain *E. faecalis* JH2-2, clumping of the donor *E. faecalis* strain 543 was demonstrated as well as high transfer frequencies in short time broth mating. Conjugative transfer of *asa1*, *traB* and *bcrRAB* genes and their co-localization was also demonstrated in the transconjugant strain T543-1 on a plasmid band of 115 kb. Sequencing of the *asa1* gene encoding for an AS of *E. faecalis* strains 543 and T543-1 further confirmed the association of this genetic element to a pheromone-responsive plasmid. More

significantly, this study presents the first evidence that a polyclonal antiserum AS₄₄₋₅₆₀ can significantly interfere with the horizontal transfer of a pheromone-responsive plasmid encoding high-level bacitracin resistance.

Sequence analysis of *asaI*, *traB* and *bcrABD* genes of strain T543-1 indicated a possible pJM01-like pheromone-responsive plasmid. In a previous study, the pJM01 was proposed to be pheromone-responsive based on the presence of negative regulator proteins of the pheromone response, TraA and TraB (Dufour et al., 2007). This plasmid encodes for the *bcrABD* genes and its regulator, *bcrR*, and the tetracycline resistance gene, *tetM*, and has a molecular weight of 72 kb (Dufour et al., 2007, Manson et al., 2004). The pJM01 slightly differs from the one described in this study because their molecular weights are different and the *tetM* gene was not present in any of our tested strains. The variable plasmid content is likely due to rearrangements which occur during the conjugation process (Vignaroli et al., 2011). At first, *bcrD* was not detected by PCR on the plasmid. The PCR primers used for the detection of *bcrD* from a previous study (Tremblay et al., 2011) amplified successfully part of this gene in the positive *bcr* genes control *E. faecalis* AR01/DGVS (Manson et al., 2004). Sequence analysis of the region above *bcrB* revealed an identity of 82% between the *bcrD* gene of this study with the ones of pJM01 and pTW9. The negative PCR amplification with the previously described primers is likely due to the average degree of homology with the *bcrD* of this study. Plasmid stability of the donor strain *E. faecalis* 543, without antimicrobial selective pressure, resulted in plasmid curing after nine passages and over 50 passages in the transconjugant strain. It is reported that plasmid partitioning and addiction systems are responsible for the stability, copy number and the maintenance of plasmids within a bacterial population (Clewell, 2007). A *par* addiction system in *E. faecalis* plasmid pAD1 has been previously described (Weaver et al., 1996). These results suggest the presence of an addiction module or partition system in the 115-kb plasmid of this study. Also, the sequence of the region beyond *bcrR* which corresponds to an IS1216-like transposase gene is likely indicative of transposon-encoded *bcr* genes. Thus, dissemination of high-level bacitracin resistance might occur in *E. faecalis* isolates by horizontal gene transfer involving both transposon and pheromone-responsive

conjugation. It has also been described that this type of conjugation could easily play a role in delivering transposons and mobilizing other elements able to replicate in the recipient microorganism (Christie et al., 1987, Francia and Clewell, 2002).

Clumping of strain 543 was observed with a light microscope after induction with pheromones produced by *E. faecalis* JH2-2. Clumping was not visible to the naked eyes. This is consistent with previous studies which were not able to observe aggregates by naked eyes (Donelli et al., 2004, Ike et al., 1998). Four pheromone genes were detected by microarray in the strain *E. faecalis* JH2-2. The pJM01-related pheromone-responsive plasmid described in this study likely responded to one of those to form aggregates. This non-specific pheromone response likely explains the levels of aggregation by the donor strain *E. faecalis* 543. It has been described that one pheromone could trigger a response to different pheromone-responsive plasmids (Hirt et al., 1993) and that different levels of aggregation were reported for different strains using pheromones from the same producer (Donelli et al., 2004). In addition, the presence of *gelE*, a gelatinase, in the donor strain *E. faecalis* 543 and the recipient strain *E. faecalis* JH2-2 could also reduce the aggregation process because this enzyme has been shown to lower the pheromone titre in the supernatant and to degrade misfolded proteins such as AS on the cell surface (Makinen et al., 1989, Waters et al., 2003)

A significant reduction of both aggregation and plasmid transfer was observed after the addition of the polyclonal antiserum AS₄₄₋₅₆₀. This is in contrast with a previous study (Schlievert et al., 2010) which observed that whole antibodies against an AS, named Asc10, promoted an increased aggregation between Asc10-expressing cells. However, when the Fabs molecules which lack ability to cross-link antigens were used the aggregation between bacterial cells was reduced. Clumping inhibition was also observed with an anti-N-terminal AS serum against an *E. faecalis* isolate containing the sex pheromone plasmid pAD1 (Hirt et al., 1993). A study also reported a significant reduction of plasmid transfer using a polyclonal anti-AS₄₄₋₅₆₀ in mating experiments (Olmsted et al., 1991). Clumping inhibition was proposed to be due to steric hindrance since antibodies and adhesins are in the same size range of about 10 nm and 18 nm,

respectively (Hirt et al., 1993). The antiserum used in this study detected only one protein, extractable from induced, but not from uninduced cells, indicating that the immunological response observed was specific. Furthermore, plasmid transfer reduction correlated well with clumping inhibition. Moreover, a significant reduction was still observed after one and two hours of conjugation indicating good interaction between the antibodies and the expressed AS.

In summary, the current study provides the evidence of interference in the *E. faecalis* conjugation pheromone-responsive process encoding for high-level bacitracin resistance. Specifically, our results demonstrated conjugative transfer and co-localization of *asaI*, *traB* and *bcrRAB* genes in strain T543-1 on a plasmid band of 115 kb. Our results further indicated a significant reduction of both aggregation and plasmid transfer processes after the addition of the polyclonal antiserum AS₄₄₋₅₆₀. Further studies are needed to determine the efficiency of such interference on *E. faecalis* bacitracin resistance transfer in an *in vitro* polymicrobial model.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was funded partly by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (M. Archambault, RGPIN-191461), the Public Health Agency of Canada (*in kind*) and the Poultry Industry Council (PIC-237) of Canada. Maurice Boissinot of the Research Center of Laval University (Québec, Canada) is gratefully acknowledged for providing the *E. faecalis* JH2-2 for this study. We also thank Luke Masson from BRIM (Montréal, Québec, Canada) for the microarrays and Guy Beauchamp for statistical analysis from the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal (St-Hyacinthe, Québec, Canada).

REFERENCES

- (Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Third Edition. *CLSI document M31-A3*, Vol. 28 No.8.
- AARESTRUP, F. M. (1995) Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. *Microb Drug Resist*, 1, 255-7.
- AN, F. Y. & CLEWELL, D. B. (1994) Characterization of the determinant (traB) encoding sex pheromone shutdown by the hemolysin/bacteriocin plasmid pAD1 in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid*, 31, 215-21.
- CHAMPAGNE, J., DIARRA, M. S., REMPEL, H., TOPP, E., GREER, C. W., HAREL, J. & MASSON, L. (2011) Development of a DNA microarray for enterococcal species, virulence, and antibiotic resistance gene determinations among isolates from poultry. *Appl Environ Microbiol*, 77, 2625-33.
- CHRISTIE, P. J., KORMAN, R. Z., ZAHLER, S. A., ADSIT, J. C. & DUNNY, G. M. (1987) Two conjugation systems associated with *Streptococcus faecalis* plasmid pCF10: identification of a conjugative transposon that transfers between *S. faecalis* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 169, 2529-36.
- CHUNG, J. W., BENSING, B. A. & DUNNY, G. M. (1995) Genetic analysis of a region of the *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10 involved in positive regulation of conjugative transfer functions. *J Bacteriol*, 177, 2107-17.
- CLARK, N. C., OLSVIK, O., SWENSON, J. M., SPIEGEL, C. A. & TENOVER, F. C. (1999) Detection of a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase gene (aadA) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 43, 157-60.
- CLEWELL, D. B. (2007) Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytolysin. *Plasmid*, 58, 205-27.
- COQUE, T. M. (2008) Evolutionary biology of pathogenic enterococci. IN BAQUERO, F., NOMBELA, C., CASSELL, G. H. & GUITIERREZ, J. A. (Eds.) *Evolutionary Biology of Bacteria and Fungal pathogens*. Washington, D.C., ASM Press.
- DIARRA, M. S., REMPEL, H., CHAMPAGNE, J., MASSON, L., PRITCHARD, J. & TOPP, E. (2010) Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus* spp: Characterization of Isolates from Broiler Chickens. *Appl Environ Microbiol*.
- DONELLI, G., PAOLETTI, C., BALDASSARRI, L., GUAGLIANONE, E., DI ROSA, R., MAGI, G., SPINACI, C. & FACINELLI, B. (2004) Sex pheromone response, clumping, and slime production in enterococcal strains isolated from occluded biliary stents. *J Clin Microbiol*, 42, 3419-27.
- DUFOUR, M., MANSON, J. M., BREMER, P. J., DUFOUR, J. P., COOK, G. M. & SIMMONDS, R. S. (2007) Characterization of monolaurin resistance in *Enterococcus faecalis*. *Appl Environ Microbiol*, 73, 5507-15.
- DUNNY, G. M., ANTIPORTA, M. H. & HIRT, H. (2001) Peptide pheromone-induced transfer of plasmid pCF10 in *Enterococcus faecalis*: probing the genetic and

- molecular basis for specificity of the pheromone response. *Peptides*, 22, 1529-39.
- DUNNY, G. M., BROWN, B. L. & CLEWELL, D. B. (1978) Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 3479-83.
- FERTNER, M. E., OLSEN, R. H., BISGAARD, M. & CHRISTENSEN, H. (2011) Transmission and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* among layer chickens during hatch. *Acta Vet Scand*, 53, 56.
- FRANCIA, M. V. & CLEWELL, D. B. (2002) Transfer origins in the conjugative *Enterococcus faecalis* plasmids pAD1 and pAM373: identification of the pAD1 nic site, a specific relaxase and a possible TraG-like protein. *Mol Microbiol*, 45, 375-95.
- GALLI, D., LOTTSPEICH, F. & WIRTH, R. (1990) Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Mol Microbiol*, 4, 895-904.
- GARCIA-MIGURA, L., PLEYDELL, E., BARNES, S., DAVIES, R. H. & LIEBANA, E. (2005) Characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from broiler poultry and pig farms in England and Wales. *J Clin Microbiol*, 43, 3283-9.
- GHIDAN, A., DOBAY, O., KASZANYITZKY, E. J., SAMU, P., AMYES, S. G., NAGY, K. & ROZGONYI, F. (2008) Vancomycin resistant enterococci (VRE) still persist in slaughtered poultry in Hungary 8 years after the ban on avoparcin. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 55, 409-17.
- GREGERSEN, R. H., PETERSEN, A., CHRISTENSEN, H. & BISGAARD, M. (2010) Multilocus sequence typing of *Enterococcus faecalis* isolates demonstrating different lesion types in broiler breeders. *Avian Pathol*, 39, 435-40.
- HIRT, H., WANNER, G., GALLI, D. & WIRTH, R. (1993) Biochemical, immunological and ultrastructural characterization of aggregation substances encoded by *Enterococcus faecalis* sex-pheromone plasmids. *Eur J Biochem*, 211, 711-6.
- IKE, Y., TANIMOTO, K., TOMITA, H., TAKEUCHI, K. & FUJIMOTO, S. (1998) Efficient transfer of the pheromone-independent *Enterococcus faecium* plasmid pMG1 (Gmr) (65.1 kilobases) to *Enterococcus* strains during broth mating. *J Bacteriol*, 180, 4886-92.
- JACOB, A. E. & HOBBS, S. J. (1974) Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J Bacteriol*, 117, 360-72.
- LANDMAN, W. J., GRUYS, E. & DWARS, R. M. (1994) A syndrome associated with growth depression and amyloid arthropathy in layers: a preliminary report. *Avian Pathol*, 23, 461-70.
- MAKINEN, P. L., CLEWELL, D. B., AN, F. & MAKINEN, K. K. (1989) Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (strain 0G1-10). *J Biol Chem*, 264, 3325-34.

- MANSON, J. M., KEIS, S., SMITH, J. M. & COOK, G. M. (2004) Acquired bacitracin resistance in *Enterococcus faecalis* is mediated by an ABC transporter and a novel regulatory protein, BcrR. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 3743-8.
- MATUSHEK, M. G., BONTEN, M. J. & HAYDEN, M. K. (1996) Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 34, 2598-600.
- OLMSTED, S. B., KAO, S. M., VAN PUTTE, L. J., GALLO, J. C. & DUNNY, G. M. (1991) Role of the pheromone-inducible surface protein Asc10 in mating aggregate formation and conjugal transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10. *J Bacteriol*, 173, 7665-72.
- OLSEN, R. H., SCHONHEYDER, H. C., CHRISTENSEN, H. & BISGAARD, M. (2011) *Enterococcus faecalis* of Human and Poultry Origin Share Virulence Genes Supporting the Zoonotic Potential of *E. faecalis*. *Zoonoses Public Health*.
- PALMER, K. L., KOS, V. N. & GILMORE, M. S. (2010) Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol*, 13, 632-9.
- PAULSEN, I. T., BANERJEE, L., MYERS, G. S., NELSON, K. E., SESHADRI, R., READ, T. D., FOUTS, D. E., EISEN, J. A., GILL, S. R., HEIDELBERG, J. F., TETTELIN, H., DODSON, R. J., UMayAM, L., BRINKAC, L., BEANAN, M., DAUGHERTY, S., DEBOY, R. T., DURKIN, S., KOLONAY, J., MADUPU, R., NELSON, W., VAMATHEVAN, J., TRAN, B., UPTON, J., HANSEN, T., SHETTY, J., KHOURI, H., UTTERBACK, T., RADUNE, D., KETCHUM, K. A., DOUGHERTY, B. A. & FRASER, C. M. (2003) Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, 299, 2071-4.
- QUIRANTES, R., GALVEZ, A., VALDIVIA, E., MARTIN, I., MARTINEZ-BUENO, M., MENDEZ, E. & MAQUEDA, M. (1995) Purification of sex pheromones specific for pMB1 and pMB2 plasmids of *Enterococcus faecalis* S-48. *Can J Microbiol*, 41, 629-32.
- SCHLIEVERT, P. M., CHUANG-SMITH, O. N., PETERSON, M. L., COOK, L. C. & DUNNY, G. M. (2010) *Enterococcus faecalis* endocarditis severity in rabbits is reduced by IgG Fabs interfering with aggregation substance. *PLoS One*, 5.
- SENO, Y., KARIYAMA, R., MITSUHATA, R., MONDEN, K. & KUMON, H. (2005) Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Med Okayama*, 59, 79-87.
- TANKSON, J. D., THAXTON, J. P. & VIZZIER-THAXTON, Y. (2001) Pulmonary hypertension syndrome in broilers caused by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, 69, 6318-22.
- TREMBLAY, C. L., LETELLIER, A., QUESSY, S., BOULIANNE, M., DAIGNAULT, D. & ARCHAMBAULT, M. (2011) Multiple-Antibiotic Resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Cecal Contents in Broiler Chicken and Turkey Flocks Slaughtered in Canada and Plasmid Colocalization of tetO and ermB Genes. *J Food Prot*, 74, 1639-48.
- VIGNAROLI, C., ZANDRI, G., AQUILANTI, L., PASQUAROLI, S. & BIAVASCO, F. (2011) Multidrug-Resistant Enterococci in Animal Meat and Faeces and Co-Transfer of Resistance from an *Enterococcus durans* to a Human *Enterococcus faecium*. *Curr Microbiol*, 62, 1438-47.

- WATERS, C. M., ANTIPOORTA, M. H., MURRAY, B. E. & DUNNY, G. M. (2003) Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J Bacteriol*, 185, 3613-23.
- WATERS, C. M. & DUNNY, G. M. (2001) Analysis of functional domains of the *Enterococcus faecalis* pheromone-induced surface protein aggregation substance. *J Bacteriol*, 183, 5659-67.
- WEAVER, K. E., JENSEN, K. D., COLWELL, A. & SRIRAM, S. I. (1996) Functional analysis of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded stability determinant par. *Mol Microbiol*, 20, 53-63.
- WIRTH, R. (1994) The sex pheromone system of *Enterococcus faecalis*. More than just a plasmid-collection mechanism? *Eur J Biochem*, 222, 235-46.

Table 1. Interference in the transfer frequencies of plasmid encoding high-level bacitracin resistance of the donor *E. faecalis* strain 543 to the recipient strain *E. faecalis* JH2-2 tested by pheromone-responsive mating experiments with or without addition of antibodies.

Exposure to pheromone ^a	Antibodies	Transfer frequency in 20-min mating (no. of transconjugants per donor cell) ^c
+	None	4.6×10^{-3}
-	None	2.2×10^{-6}
+	pre-immune serum	8.3×10^{-3}
+	None	4.6×10^{-3}
+	polyclonal anti-AS ₄₄₋₅₆₀	4.4×10^{-5}
+	None	7.5×10^{-2}
-	None	6.3×10^{-7}

(a) +, exposed; -, not exposed. (b) Culture filtrate of JH2-2 was used as the pheromone.

(c) Transfer rates are represented by an average of three independent replicates.

Figure 1. PFGE and hybridization of strains *E. faecalis* 543 and T543-1.

PFGE (A) and Southern blot with Dig-labelled probes *traB* (B), *asal* (C), and *bcrA* (D). Wells loaded with the donor strains *E. faecalis* 543 (1) and the *E. faecalis* T543-1 (2); molecular weight marker (M) (in kb).

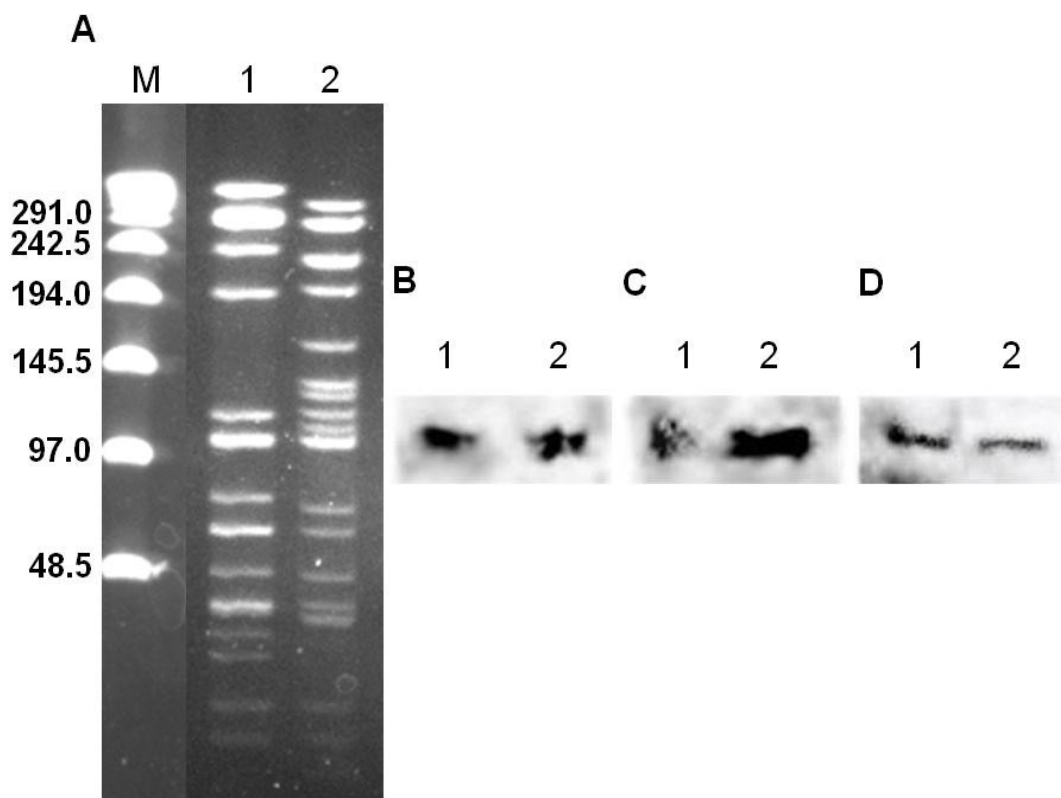


Figure 2. SDS-PAGE and Western blot of the purified protein AS.

(A) SDS-PAGE: Line M, molecular marker; Line 1, 5 μ g of purified protein AS. (B) Western blot: Line M, molecular marker; Line 1, 100 ng protein; Line 2, 50 ng protein; Line 3, 10 ng protein. Primary antibodies: rabbit antiserum after 4th immunisation 1:1000. Secondary antibodies: IRDye TM800 conjugated goat anti-rabbit IgG 1:7500.

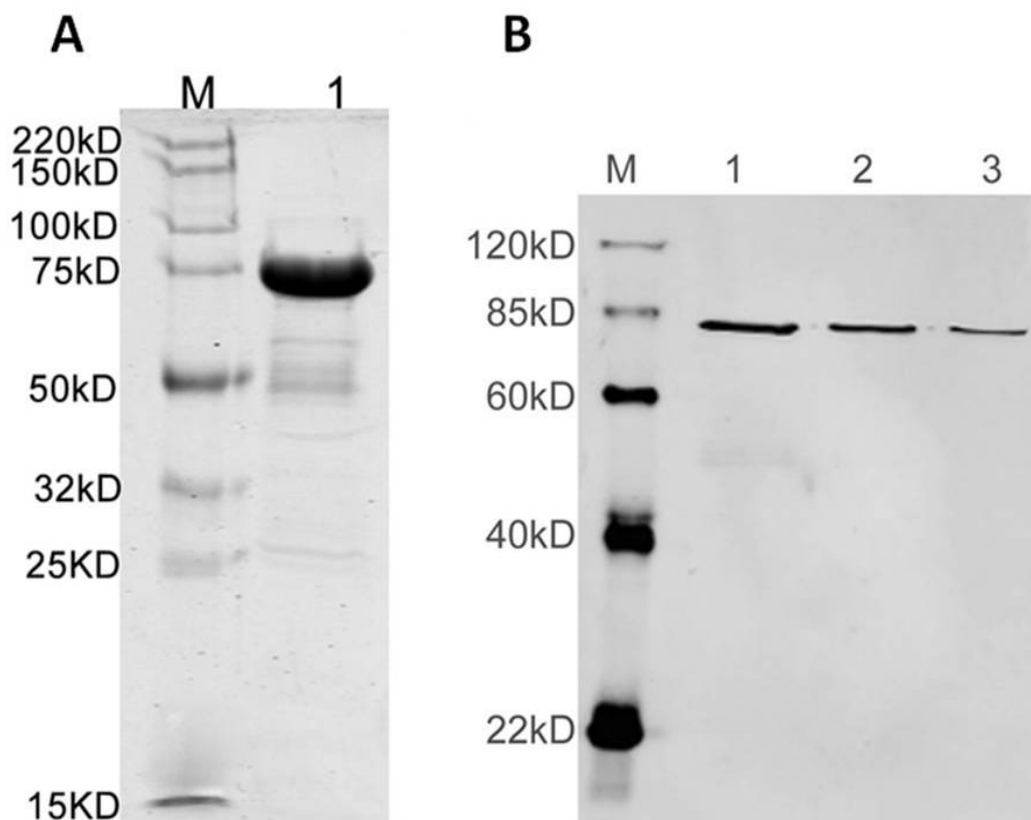


Figure 3. Western blot on *E. faecalis* protein extracts and purified Agg protein.

Hybridization with antiserum Agg 1:1000. Wells loaded with : (1) *E. faecalis* JH2-2 protein extract; (2) *E. faecalis* 543 induced protein extract; (3) *E. faecalis* 543 uninduced protein extract; (4) ca. 10 ng of purified Agg protein; (M) PageRuler prestained protein ladder in kDa.

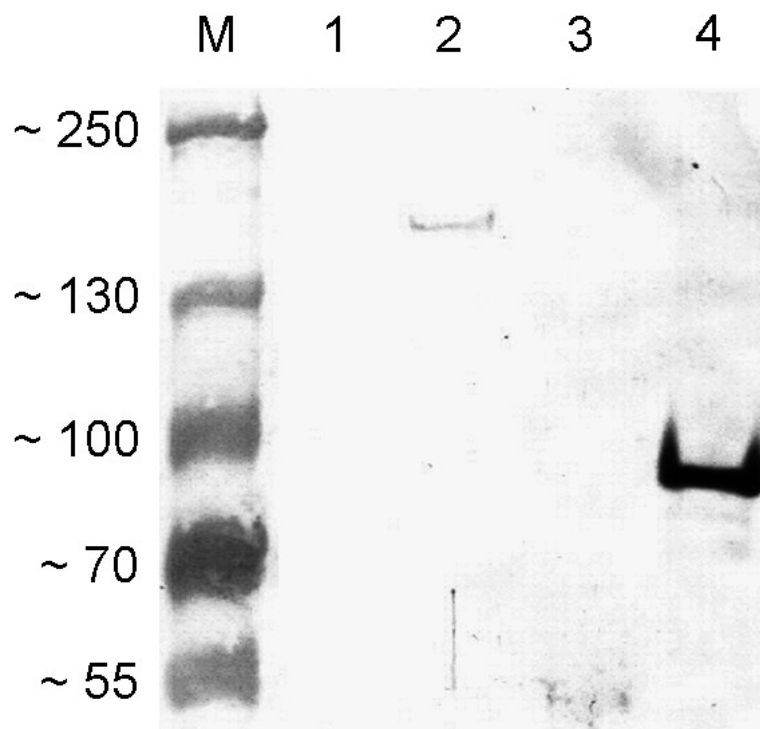


Figure 4. Clumping assays with *E. faecalis* 543 induced and *E. faecalis* JH2-2.

(a) Non-induced; (b) Induced; (c) with pre-immune serum; (d) with antiserum Agg 1/10. Magnification of 400X. The same observation was made with antiserum Agg 1/5 as for the dilution 1/10 (data not shown).

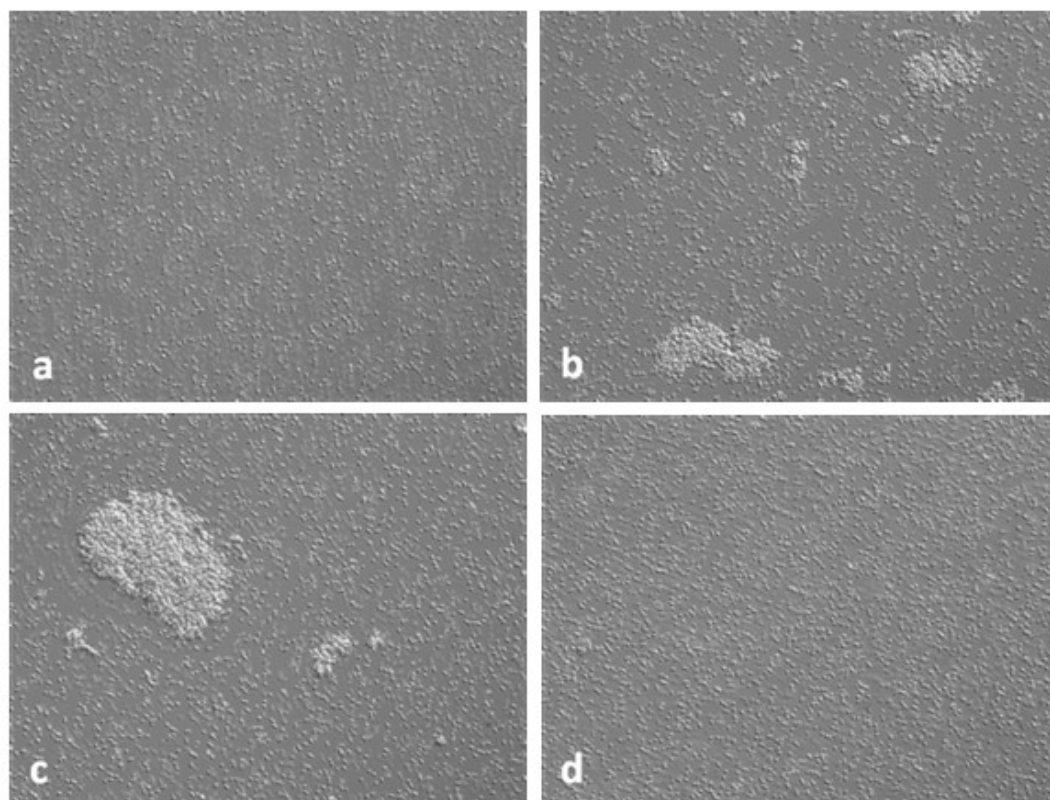
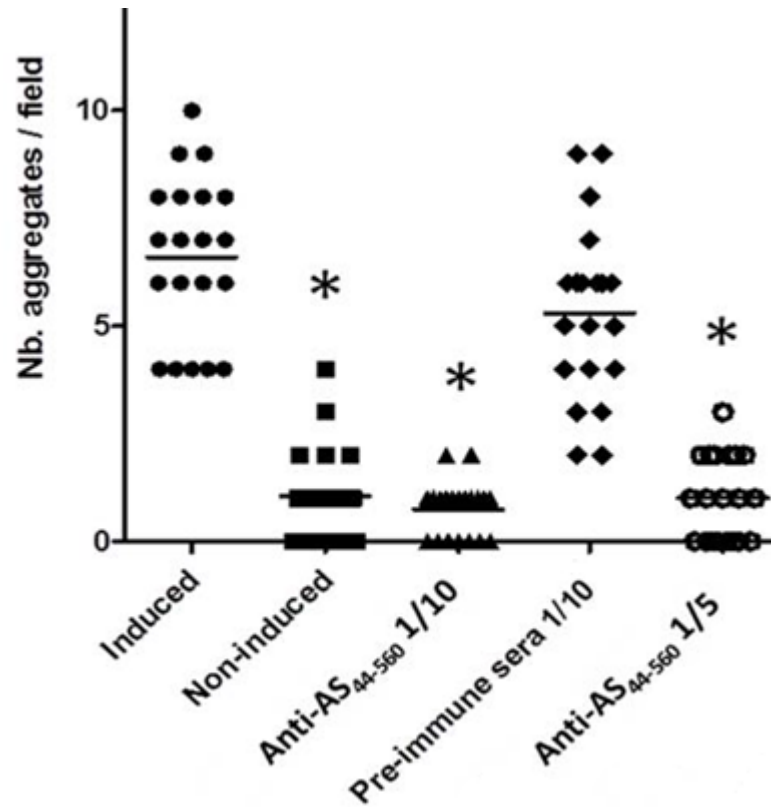


Figure 5. Interference in the formation of aggregates of *E. faecalis* 543 using anti-AS₄₄₋₅₆₀ antibodies by microscopy.

Quantification was made on twenty fields for each condition. Straight lines represent the average of aggregates by field. *, significant differences were observed compared to induced state ($P < 0.05$).



ARTICLE IV :

**“Characterization of Clinical Isolates of
Ampicillin-Resistant *Enterococcus faecium* CC17
(ST17)-Related Lineages from Dogs and
Humans”**

Cindy-Love Tremblay¹, Audrey Charlebois¹, Luke Masson², and Marie Archambault^{1*}

¹ University of Montreal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology and Microbiology, GREMIP research group, 3 200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Quebec, Canada; and ² National Research Council of Canada, Biotechnology Research Institute, Montreal, H4P 2R2, Quebec, Canada.

* Corresponding author: Marie Archambault, Tel : 450-773-8521, Ext 8679; Fax : 450-778-8108.

Soumission prochaine dans : "PLoS One"

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article : Je suis la première auteure de l'article. J'ai activement participé à la conception expérimentale; J'ai substantiellement effectué la recherche, l'analyse des données et écrit le manuscrit.

Characterization of Clinical Isolates of Ampicillin-Resistant *Enterococcus faecium*
CC17 (ST17)-Related Lineages from Dogs and Humans.

Cindy-Love Tremblay¹, Audrey Charlebois¹, Luke Masson², and Marie Archambault^{1*}

Keywords: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, clinical, antibiotic resistance, virulence, plasmid, CC17 (ST17)

¹University of Montreal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology and Microbiology, GREMIP research group, 3 200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Quebec, Canada; ² National Research Council of Canada, Biotechnology Research Institute, Montreal, H4P 2R2, Quebec, Canada.

*Corresponding author: Marie Archambault, Tel : (1) 450-773-8521 ext 8679;
Fax: (1) 450-778-8108

ABSTRACT

This report describes for the first time the characterization of canine clinical ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* (AREF) isolates related to CC17 (ST17) in Canada. Ciprofloxacin, lincomycin, tetracycline, high-level gentamicin, -kanamycin and -streptomycin resistances and macrolides resistance were also observed. No resistance was observed to linezolid, quinupristin-dalfopristin, and vancomycin antibiotics. Fluoroquinolone resistance was attributable to ParC (Ser80 → Arg, Ile or Asp; and Asn73 → Asp) and GyrA (Ser83 → Arg, Tyr, or Ile; Met127 → Trp; and Glu87 → Lys) mutations. GyrB (Asp436 → Asn, Leu371 → Trp and Pro455 → Ser) mutations were also observed. Data demonstrated the complete absence of enterococcal surface protein (*esp*) and hyaluronidase (*hyl*) encoding genes among the canine AREF isolates tested while all were *acm* (collagen binding protein)-positive. Also, most of them were shown to harbor *efaA_{fm}* gene, encoding for a cell wall adhesin. No gelatinase, cytolytic or biofilm activities or clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) were identified in these isolates. Families of plasmids *rep₆* and *rep₁₁* were significantly associated with isolates from dogs. The PFGE patterns of dog and human isolates were considered unrelated ($\leq 80\%$). The results indicated that canine AREF isolates can harbor multi-drug (3 to 7 in this study) resistance with ciprofloxacin, lincomycin, and tetracycline as the most common combination with or without high-level gentamicin, kanamycin and streptomycin resistances. These findings also support the importance of prudent use of antibiotics in veterinary medicine to avoid zoonotic spread of canine AREF isolates.

INTRODUCTION

Enterococci are opportunistic pathogens and form part of the normal gastrointestinal flora in humans and animals. They have been associated with diarrhea, mastitis, urinary tract and catheter-associated infections, and cholangiohepatitis in small animals [1,2,3,4]. In humans, enterococci cause similar diseases such as opportunistic bacteremia, endocarditis, urinary tract and surgical wound infections especially in immunocompromised patients [5]. The incidence of enterococci nosocomial infections has been reported to increase rapidly over the past 20 years in the United States and the European Union [6,7,8].

In humans, *Enterococcus faecalis* is the causative agent in most enterococcal infections. But more recently, multidrug-resistant *Enterococcus faecium* infections have been reported and in some countries, they represent up to one-third of enterococcal infections [9]. Changes in the patterns of antibiotic usage have been suggested as a possible explanation for the emergence of a distinct genogroup of hospital-associated ampicillin-resistant *E. faecium* (AREF) strains, currently named clonal complex 17 (CC17) [10]. ST17 is the predicted founder of this genetic subpopulation [11]. Most clinical AREF isolates with moderate or high levels of ampicillin resistance produce, respectively, either increased levels (overproduction) of an alternate penicillin-binding protein (PBP5) or a PBP5 with specific amino acid substitutions that contribute to important lower levels of affinity toward benzylpenicillin [12,13,14]. CC17 isolates are characterized by resistance to ampicillin and fluoroquinolones. Most CC17 isolates harbor virulence genes encoding enterococcal surface protein (*esp*), hyaluronidase (*hyl*) and collagen binding protein (*acm*) which are considered markers for CC17 [8,15]. These genes are found less frequently among other *E. faecium* lineages [16,17,18]. The main concern with AREF is that penicillins alone or in combination with gentamicin are one of the few treatments available for life-threatening enterococcal infections such as endocarditis; vancomycin being the last option [19].

E. faecium isolates of animal origin have been reported to be host specific and usually unrelated to human lineages of clinical importance [20,21]. But recently, infections

attributed to *E. faecium* CC17 have been reported in dogs [19,22,23] and pigs [24,25]. Dogs seem to be frequent carriers of CC17-related lineages and may play a role in the spread of this nosocomial agent [22]. A recent report suggested that the CC17 lineage is more able to infect dogs as well as humans than other lineages [26]. It was also demonstrated that the pulsed field gel electrophoresis patterns of some dog and human isolates were over 90% similar [26].

Other virulence factors associated with enterococcal infections in both animals and humans include gelatinase (*gelE*), cytolysin, aggregation substance, and lipoteichoic acid [27,28]. The genes *gelE* and *esp* have been shown to enhance the biofilm formation of *E. faecalis* and *E. faecium* [29,30]. Biofilm formation likely confers some significant survival advantages by increasing bacterial resistance to stressful environmental conditions and antibiotic exposure. The rise in the antibiotic resistance in enterococci is directly linked to the horizontal transfer of antibiotic resistant genes by plasmid conjugation [31]. Clustered, regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) have been shown to provide bacteria with sequence-specific, acquired defense against plasmids and phages [32,33]. Mobile elements constitute up to 25% of the genome of multidrug-resistant enterococci [34]. A recent study has demonstrated a significant association between the absence of CRISPR-*cas* locus and acquired antibiotic resistance in enterococci [34]. It was suggested that this inverse relationship between CRISPR-*cas* and antibiotic resistance may indicate that antibiotic use inadvertently selects for enterococcal strains with compromised genome defense [34]. Following these findings, canine and human *E. faecium* clinical isolates from Québec, Canada, were characterized by multilocus sequence typing (MLST), pulsed field gel electrophoresis (PFGE), antibiotic susceptibility, gelatinase, hemolytic and biofilm activities, presence of *rep*-families and CRISPR-*cas* and putative virulence gene profiling to assess the genetic relationship between these isolates.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial isolates and identification

E. faecium clinical isolates ($n = 10$) used in the study are listed in Table 1. Human isolates ($n = 5$) were randomly provided by the “Centre de Recherche Hospitalier de l’Université Laval (CRCHUL)”. Isolates of dog origin ($n = 5$) were randomly selected from the clinical culture collection of the diagnostic laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal. All isolates were identified by multiplex PCR assay using species-specific primer sets for the *EMI faecium* (strongly conserved *E. faecium* genomic DNA fragment) identification gene as previously described [35]. *E. faecium* HA-56038 were used as positive controls.

PFGE

Isolates were analyzed for clonal diversity by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) after *Sma*I (New England Biolabs, Inc., Beverly, Ma, USA) digestion as described by Garcia-Migura et al. [36]. The digested DNA was electrophoresed as previously described [37]. Differences between isolates were carried out using Bionumerics Version 6.5 software (Applied Maths, Austin, TX, USA). The approach was based on unweighted pair group method (UPGMA), Dice coefficient algorithm. PFGE types were determined as $\geq 80\%$ similarity.

MLST

Multilocus sequence typing (MLST) was based on seven housekeeping genes (*atpA*, *ddl*, *gdh*, *purK*, *gyd*, *pstS*, and *adk*) of *E. faecium*. Different sequences were assigned allele numbers, and different allelic profiles were assigned STs based on the MLST database (<http://www.mlst.net/databases/>). Analysis was performed using the eBURST version 3 algorithm implemented as a Java applet at <http://eburst.mlst.net>.

Antibiotic susceptibility testing

Isolates were tested for MIC using the Sensititre plate CMV3AGPF (TrekTM Diagnostic System Ltd, Cleveland, OH) according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M31-A3 and M100-S20) guidelines [38,39]. Ciprofloxacin and ampicillin

susceptibilities were further analyzed by standard broth macrodilution method (CLSI, M31-A3 and M100-S20). Breakpoints from CLSI and CIPARS were used [40]. *Staphylococcus aureus* ATCC29213 and *E. faecalis* ATCC29212 were used as quality controls.

DNA Microarrays

Hybridization experiments on the microarray were performed as previously described by Champagne et al. [41]. A microarray, developed for *Enterococcus* [42] at the Biotechnology Research Institute in Montreal (BRIM), carrying 70 taxonomic probes, 15 virulence factors, and 173 antibiotic resistance probes for a total of 262 probes was used for the detection of putative target genes. Briefly, bacterial DNA isolated from single colonies was labelled with Cy5-dCTP (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Hybridization, washing, scanning, image processing, scoring, and data analysis were done as previously described [41]. Arrays were scanned by a ScanArray Express microarray Scanner (Packard Biosciences, Billerica, MA, USA). Oligonucleotides with a signal-to-noise fluorescence ratio above 3 were considered positive. Microarray results were confirmed by PCR with specific primers [43,44,45,46]. Since *erm*(AM) and *erm*(B) shared over 80% similarity and are perfectly correlated, they were considered as the same in this study as previously proposed [47].

PCR detection of virulence and antibiotic resistance genes

PCR amplifications were performed with specific primers encoding for virulence genes *acm* and *hyl* [27,48,49] and the quinolone resistance-determining regions (QRDR) genes of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* as previously described [15]. Sequences were compared with the *E. faecium* DO genome in GenBank.

PCR for *repA* genes (plasmid families)

All isolates were screened for *rep*-like sequences by PCR as previously described [50] with few modifications (Table S1). Six multiplex PCR and a single PCR were performed. PCR amplified and sequenced products were used as positive controls for respective *rep*-families.

Detection of CRISPR-*cas*

CRISPR1-*cas*, CRISPR2, and CRISPR3-*cas* locus were screen with primers and conditions as previously described [34] with slight modifications. Briefly, the PCR reactions were performed in a total of 50 μ l, using 80 pmol of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM each of dNTPs, 2 U of Taq DNA, 1X Buffer mix (New England Biolabs) and sample DNA. Amplification reactions were carried out using a Whatman Biometra thermocycler (Montreal Biotech Inc, Québec, Canada) programmed as follows: an initial denaturation step of 94°C for 2 min, 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing for 1 min and extension at 72°C for 1 min, followed by a final elongation at 72°C for 5 min. For visualization, 5 μ l of the PCR reaction were subjected to electrophoresis in 1.2% agarose gel stained with ethidium bromide. A 100 bp ladder (TrackIt, Invitrogen, Ontario, Canada) was used as a marker. PCR amplified and sequenced products were used as positive controls.

Gelatinase activity

Determination of gelatinase-producing isolates was carried out on lysogeny broth (LB) agar containing 3% (wt/vol) gelatine. After incubation at 37°C for 24 h, plates were stored at 4°C for 5 h according to Eaton and Gasson [51]. Zones of turbidity around colonies indicated gelatinase production.

Cytolysin activity

Columbia agar plates containing 5% sheep blood (Oxoid, Thermo Fisher, Nepean, Ontario, Canada) and Columbia agar plates supplemented with 5% horse blood (BioMérieux, Montréal, Québec, Canada) were used to detect cytolysin activity as previously described [52]. Agar plates were incubated under aerobic and anaerobic conditions at 37°C (AnaeroGenTM, Oxoid) for 24 h. The production of cytolysin appeared in clear zones (β -haemolysis) around colonies.

Biofilm formation

Isolates were inoculated in tryptic soy broth (TSB) supplemented with 1% glucose in microtiter plate of 96 wells (Fisher scientific) for bacterial growth and biofilm formation

as previously described [53]. Biofilm was quantified using crystal violet staining method as described by Zoletti et al. [53]. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (biofilm producer) and wells containing uninoculated medium were used as controls. ODs were obtained using a microplate reader Biotek Synergy HT (Bio-tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) at a wavelength of 570 nm. Comparative analyses, based on two replicates, were performed as previously described [54] using the wells containing the uninoculated medium as negative controls.

Statistical analysis

A chi-square exact test was used to examine the association between isolate, origin, antibiotic resistance, virulence genes, gelatinase activity, biofilm formation, plasmid families and CRISPR genes. Statistical analyses were carried out using SAS software v. 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA). The level of statistical significance was set at 0.05.

RESULTS

MLST and PFGE

A total of 7 STs were found in *E. faecium* isolates, ST1 ($n = 1$), ST18 ($n = 2$), ST65 ($n = 1$), ST202 ($n = 2$), ST205 ($n = 1$) and two novel STs (isolates M2146-08, M5853-09 and M20638-11) which were related to ST17 ($n = 2$) and ST187 ($n = 1$) by a single locus variant (<http://efaecium.mlst.net/>) (Fig. 1 and S1). Also, STs 202, 18 and 205 were grouped with ST17 predicted as the primary founder (Fig. S1). The human isolate CCRI-16717 defined as ST1 was shown to belong to a cluster containing primarily isolates from calves in the Netherlands (<http://efaecium.mlst.net/>). ST65 (isolate CCRI-18707) was not linked to any other ST in the database. Following genomic digestion with the restriction enzyme *Sma*I and PFGE, the *E. faecium* isolates ($n = 10$) of human and canine origins produced 10 macro-restriction patterns clustered into eight PFGE types, termed A through H (Fig. 1). The PFGE patterns of *E. faecium* isolates 07-5598 (subtype A1) and M2971-08 (subtype A2) of canine origin differed by only 1 DNA fragment and were $\geq 96\%$ similar. The PFGE pattern of *E. faecium* isolates M2146-08 (subtype E1) and M5853-09 (subtype E2) of canine origin differed by only 3 DNA fragments and were $\geq 89\%$ similar. The remaining *E. faecium* isolates were considered unrelated ($\leq 80\%$). There was not a total agreement between the ST and the PFGE types. The *E. faecium* PFGE types B and H were set as a same group by MLST (ST18) (Fig. 1).

Antibiotic resistance

Resistances to ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, kanamycin, nitrofurantoin, penicillin, ampicillin, streptomycin, tetracycline, tylosin, and vancomycin were observed in *E. faecium* clinical isolates of human origin (Table 1). No resistance to chloramphenicol, daptomycin, linezolid, quinupristin/dalfopristin and tigecycline was observed in these isolates. Chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, kanamycin, penicillin, ampicillin, streptomycin, tetracycline, and tylosin resistances were observed in *E. faecium* clinical isolates of canine origin with no resistance observed to daptomycin, linezolid, nitrofurantoin, quinupristin/dalfopristin, vancomycin and tigecycline. All *E. faecium* isolates were resistant to ampicillin, ciprofloxacin and lincomycin. Significant differences were noted between *E. faecium* and particular

antibiotic resistances (p -value < 0.05). Most importantly, *E. faecium* was positively associated with ciprofloxacin and penicillin resistances. All *E. faecium* isolates demonstrating erythromycin resistance were also resistant to tylosin, both macrolides antibiotic agents. Positive correlations demonstrated with erythromycin were also observed with tylosin. A positive association between gentamicin, kanamycin and streptomycin resistances was also observed. These drugs are all part of the aminoglycoside class of antibiotics. Also, erythromycin resistance was positively associated with the aminoglycoside resistances, while ciprofloxacin resistance correlated with gentamicin and penicillin resistances. Among other points to note, all vancomycin resistant *E. faecium* ($n = 3$) isolates were of human origin.

Microarray and PCR analysis of virulence and antibiotic resistant genes

Virulence and antibiotic resistant genotypes are presented in Table 2. Our results demonstrated the complete absence of *esp* and *hyl* genes among the canine AREF isolates tested while all were *acm*-positive. Also, most of them were shown to harbor *efaA_{fm}* gene, encoding for a cell wall adhesin. The *efaA_{fm}* gene was also detected in all human isolates but one. The most prevalent gene was *acm* ($n = 10$) detected in all *E. faecium* isolates of human and canine origin. Two human isolates were also positive for the hyaluronidase gene, *hyl*. One canine *E. faecium* isolate had also the *agg* gene encoding for an aggregation substance of pheromone-responsive plasmid. Acquisition of multiple antibiotic resistant genes was observed ranging from 2 to 14 per isolate. The most prevalent antibiotic resistance genes detected were *aac(6')-II* ($n = 10$), encoding for aminoglycoside resistance, and *msrC* ($n = 10$), encoding for a macrolide efflux pump. The transposase genes *trans* (SK11 plasmid) and *transI* (IS150-like) associated with transposons carrying multiresistance gene clusters were also identified in many isolates ($n = 9$). These genes and the IS150 transposase gene associated with plasmid pUW786 were significantly associated with *E. faecium* (p -value < 0.05). A correlation was observed between *aadE* (high-level streptomycin resistance), *aph(3')-IIIa*, (aminoglycoside resistance), *sat(4)* (streptothricin acetyltransferase) and IS1182 transposase gene (associated with plasmid pUW786) in human isolates of *E. faecium*. The *tet(M)*, *tet(L)* and *tet(O)* genes (tetracycline resistance) were detected in 7, 5 and 2

E. faecium isolates, respectively. Also, significant differences in the gene distributions were observed between hosts (p -value < 0.05). The antibiotic resistant genes *erm*(AM) (macrolide-lincosamide-streptogramin B, MLS_B), *erm*(B) (MLS_B), *aadE*, *sat*(4), *aph*(3')-IIIa were significantly associated with human isolates. Also, positive associations were observed between *transI* and *IS150* transposase genes, *aac*(6')-Ie-*aph*(2'')-Ia (encoding for a bi-functional aminoglycoside-modifying enzyme) and *erm*(B).

Screening for *gyrA/B* and *parC/E* mutations

E. faecium isolates spanned a range of ciprofloxacin MICs from ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ to > 256 $\mu\text{g/ml}$ with seven isolates considered as high-level ciprofloxacin-resistant (MICs of > 16 $\mu\text{g/ml}$). High-level ciprofloxacin resistance was attributable to ParC (Ser80 \rightarrow Arg, Ile or Asp; and Asn73 \rightarrow Asp) and GyrA (Ser83 \rightarrow Arg, Tyr, or Ile; Met127 \rightarrow Trp; and Glu87 \rightarrow Lys) mutations (Table 3). All high-level ciprofloxacin-resistant isolates had mutations in both GyrA (Ser83 \rightarrow Arg or Tyr or Ile) and ParC (Ser80 \rightarrow Arg or Ile or Asp). Corresponding fragments of subunits B (*parE/gyrB*) were also investigated. Two isolates demonstrated mutations in GyrB (Asp436 \rightarrow Asn, Leu371 \rightarrow Trp and Pro455 \rightarrow Ser) whereas no changes in ParE were detected (Table 3). Isolates with MICs of < 16 $\mu\text{g/ml}$ did not harbour mutational changes.

repA genes (plasmid families)

Nine different *rep*-family genes of plasmid (*rep*₁₋₂, *rep*₄, *rep*₆, *rep*₁₁, *rep*₁₄, *rep*₁₇₋₁₈ and *rep*_{Unique}) were detected in *E. faecium* isolates (Table 2). No positive PCR products were obtained from the families' *rep*₃, *rep*₅, *rep*₇₋₉, *rep*₁₀, *rep*₁₃, *rep*₁₅₋₁₆ and *rep*₁₉. The predominant *rep*-family among *E. faecium* isolates was *rep*₁₁ (pEF1071) with seven isolates. Other *rep*-families were also observed: *rep*₁ (pIP501) ($n = 2$), *rep*₂ (pRE25) ($n = 6$), *rep*₄ (pMBB1) ($n = 1$), *rep*₆ (pS86) ($n = 5$), *rep*₁₄ (pRI1) ($n = 5$), *rep*₁₇ (pRUM) ($n = 3$), *rep*₁₈ (pEF418) ($n = 1$) and *rep*_{Unique} (pUB101) ($n = 3$). Overall, *rep*₁₁ and *rep*₆ families were significantly (p -value < 0.05) associated with isolates of canine origin.

CRISPR-*cas* genes

To determine whether there is an association between CRISPR elements and plasmid family genes, virulence and/or antibiotic resistance genes, CRISPR-*cas* (*csnI*) genes were investigated using PCR. Because divergence of *csnI* genes may have led to false-negative PCR results, isolates with negative PCR results were further screened with primers flanking the conserved locations of the CRISPR1-*cas* and CRISPR3-*cas* loci, between homologues of EF0672-EF0673 and EF1760-EF1759, respectively. No PCR-products were detected in *E. faecium* isolates (Table 2) and no correlations could be made with the absence of antibiotic resistance, virulence, and plasmid family genes.

Gelatinase, cytolysin, and biofilm activities

No gelatinase or hemolytic activities were observed in *E. faecium* isolates (Table 2). Only two isolates of *E. faecium* were biofilm producers, one weak and one strong both harboring the *esp* gene (Table 2). However, one *E. faecium* isolate was positive for the *esp* gene but did not produce biofilm.

DISCUSSION

E. faecium strains have been known to be host specific, to cluster according to the species of origin and to be usually unrelated to human lineages of clinical importance [20,21]. However, recent data are providing new insights between AREF isolates of dogs and humans. In Europe, healthy dogs have been recently identified as frequent carriers of human hospital-associated AREF CC17 and associated lineages [19,22]. In the United States, similar findings were observed from feces of dogs leaving the intensive care unit (ICU) of a veterinary medicine teaching hospital [23]. The first canine AREF CC17 clinical isolates were recently recovered from urinary tract infections (UTI) in veterinary teaching hospitals and local veterinary hospitals (VTH) in Seoul, Republic of Korea [26]. Also, a difficult case of canine UTI associated with AREF and *Escherichia coli* was recently recorded at a diagnostic laboratory of the Faculty of Life Sciences of the University of Copenhagen, Denmark [19]. It has been suggested that the CC17 lineage is more able to infect dogs as well as humans than other lineages [26]. It was also demonstrated by pulsed field gel electrophoresis that the patterns of some canine and human isolates were over 90% similar [26].

To our knowledge, we describe for the first time the characterization of canine clinical AREF isolates related to CC17 (ST17) in Canada. These isolates were recovered from UTI, wounds and cholangiohepatitis. They predominantly belonged to lineages related to ST17 and more interestingly, with two novel ST17-related lineages. The levels of resistance of these isolates to some of the most clinically relevant antibiotics were comparable or higher to what was previously described in canine AREF strains [19,26] with some particularities. Most importantly, all canine AREF isolates were resistant to ciprofloxacin and lincomycin. High-level gentamicin, -kanamycin and -streptomycin resistances and macrolides resistance were also common (occurring in 40% of isolates). The frequency of tetracycline resistance was also high (80%) whereas vancomycin resistance was not detected. Both vancomycin and gentamicin are first-line antibiotics for the treatment of life-threatening enterococcal infections in humans, either used separately or in combination with β -lactams [55]. Vancomycin resistance is infrequently reported in pet animals [56,57]. In this study, no resistance was observed to linezolid and

quinupristin-dalfopristin antibiotics which are often considered second-line choices for AREF infections in humans [22].

In the present study, all AREF CC17-related isolates with high-level ciprofloxacin resistance (MIC > 16 µg/ml) were associated with amino acid changes in topoisomerase IV and DNA gyrase. Jureen et al. [58], showed a correlation between ampicillin and ciprofloxacin resistance among genetically highly similar isolates that also carried the *purK-1* allele, indicative for CC17. This is consistent with our observations. Also, higher MICs have been occasionally observed in mutants with acquired amino acid changes in both *gyrA* and *parC* [59]. Previous studies in enterococci did not observe mutations in the *gyrB* target [15,60,61] but two isolates in the present study had three amino acid substitutions in GyrB. The contribution of these amino acid changes in GyrB to ciprofloxacin resistance is difficult to evaluate because the amino acid changes in GyrA and ParC are sufficient to confer high-level resistance to ciprofloxacin.

Several other resistance mechanisms may be responsible for (low-level) ciprofloxacin resistance in CC17-related isolates that do not contain amino acid changes in the QRDRs of ParC and GyrA. Resistance by active efflux of quinolones or increased expression of endogenous efflux pumps are alternative quinolone resistance mechanisms reported for *E. faecalis* [62,63]. Recently, characterization of EfmA, a multidrug efflux pump conferring resistance to quinolones and macrolides, from *E. faecium* has been described [64]. This might explain low-level ciprofloxacin resistance in some of the CC17-related isolates of this study.

Most AREF CC17 isolates of human origin have been shown to harbor virulence genes encoding enterococcal surface protein (*esp*), hyaluronidase (*hyl*) and collagen binding protein (*acm*) which are all considered markers for CC17 [11,15]. It has been established that the gradual accrual of virulence factors (*esp*, *fms*, *hyl*) and resistance genes (for streptomycin, ampicillin, gentamicin, and vancomycin) resulted in the formation of the genogroup CC17 [11,65]. Canine AREF isolates usually carry much less virulence traits [22]. In one study, all canine isolates were shown to carry *acm*, a gene encoding a collagen binding protein that plays an important role in colonization, but rarely harbored

esp and *hyl* [26]. Similarly, our results demonstrated the complete absence of *esp* and *hyl* genes among the canine AREF isolates tested while all of them were *acm*-positive. Also, most of them were shown to harbor *efaA_{fm}* gene, encoding for a cell wall adhesin, which is homolog to the endocarditis-associated virulence gene *efaA* of *E. faecalis* [66,67]. The *efaA_{fm}* gene was also detected in four human isolates while *acm* was carried by all. Moreover, two human isolates were positive for the *hyl* gene. The canine AREF isolates of this study have shown no gelatinase, cytolytic or biofilm activities and CRISPR elements were absent. This is in agreement with a recent report where none of the canine *E. faecium* tested formed biofilm and all lacked the strong gelatinase phenotype as well as *esp* [23]. In this study, the occurrence of virulence genes of canine isolates in comparison with that of human isolates were similar on two occasions with *efaA_{fm}* and *acm* being the only two virulence genes identified. However, these isolates were grouped differently by both PFGE and MLST. A previous report has suggested that canine AREF would represent early evolutionary ancestors of human pathogenic strains [22]. Further research is needed to assess the virulence of canine strains in comparison with that of human strains and, more generally, to quantify the magnitude of this possible emerging zoonotic problem.

In this study, *E. faecium* was significantly associated with multiple antibiotic resistant genes, whereas virulence genes were observed less frequently. This is consistent with previous studies indicating that *E. faecium* remains generally more resistant to antibiotics than *E. faecalis* which usually harbour many virulence genes [57,68]. It has been suggested that this possibly reflects the greater prevalence of *E. faecalis* in enterococcal nosocomial infections [69]. *rep₆* and *rep₁₁* families of plasmids were significantly associated with isolates from dogs. The *rep₆* plasmid family is known to be a group of small cryptic plasmids [50]. Detection of *rep*-families has been considered a useful tool for these plasmid types because they have no detectable phenotypes. Recent studies on the prevalence of one of these cryptic plasmids (pRI1) based on replicon typing have shown high prevalence among enterococci of animal and human origins, indicating a possible wide distribution of these cryptic plasmids [70]. The *rep₁₁* family was shown to contain genes for toxin production [50]. A significant correlation between

the absence of CRISPR-*cas* loci and the presence of antibiotic-resistance genes was previously described for *E. faecalis* [34]. No such inverse correlation was found in *E. faecium* in this study.

In summary, the current study provides the first characterization of canine clinical AREF isolates related to CC17 (ST17) in Canada. Our results further indicate that canine AREF isolates can harbor multi-drug (3 to 7 in this study) resistance with ciprofloxacin, lincomycin, and tetracycline as the most common combination with or without high-level gentamicin, kanamycin and streptomycin resistances. These findings also support the importance of prudent use of antibiotics in veterinary medicine to avoid zoonotic spread of canine AREF isolates. Further studies are needed to understand the significance of dogs in the spread of this nosocomial pathogen in the community. The occurrence of AREF in dogs and other domestic animals could be addressed by national programs in order to explore the importance of the animal reservoir in the evolution of human hospital-associated enterococci.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was funded partly by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (M. Archambault, RGPIN-191461) and the Public Health Agency of Canada (*in kind*). We want to thank Dr. Maurice Boissinot from the Research Center of Laval University to provide human clinical isolates. We want to thank the Diagnostic Laboratory at the Faculty of Veterinary Medicine of University of Montreal to provide animal clinical isolates. We also thank Guy Beauchamp at the Faculty of Veterinary Medicine of University of Montreal for his help in statistical analysis.

REFERENCES

1. Helie P, Higgins R (1999) Diarrhea associated with *Enterococcus faecium* in an adult cat. J Vet Diagn Invest 11: 457-458.
2. Manson JM, Keis S, Smith JM, Cook GM (2003) Characterization of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VREF) isolate from a dog with mastitis: further evidence of a clonal lineage of VREF in New Zealand. J Clin Microbiol 41: 3331-3333.
3. Marsh-Ng ML, Burney DP, Garcia J (2007) Surveillance of infections associated with intravenous catheters in dogs and cats in an intensive care unit. J Am Anim Hosp Assoc 43: 13-20.
4. Pressel MA, Fox LE, Apley MD, Simutis FJ (2005) Vancomycin for multi-drug resistant *Enterococcus faecium* cholangiohepatitis in a cat. J Feline Med Surg 7: 317-321.
5. Sava IG, Heikens E, Huebner J (2010) Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. Clin Microbiol Infect 16: 533-540.
6. Oteo J, Cuevas O, Navarro C, Aracil B, Campos J (2007) Trends in antimicrobial resistance in 3469 enterococci isolated from blood (EARSS experience 2001-06, Spain): increasing ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. J Antimicrob Chemother 59: 1044-1045.
7. Rice LB (2001) Emergence of vancomycin-resistant enterococci. Emerg Infect Dis 7: 183-187.
8. Top J, Willems R, van der Velden S, Asbroek M, Bonten M (2008) Emergence of clonal complex 17 *Enterococcus faecium* in The Netherlands. J Clin Microbiol 46: 214-219.
9. Iwen PC, Kelly DM, Linder J, Hinrichs SH, Dominguez EA, et al. (1997) Change in prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from blood cultures over an 8-year period. Antimicrob Agents Chemother 41: 494-495.
10. Willems RJ, Top J, van Santen M, Robinson DA, Coque TM, et al. (2005) Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. Emerg Infect Dis 11: 821-828.
11. Top J, Willems R, Bonten M (2008) Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. FEMS Immunol Med Microbiol 52: 297-308.
12. Fontana R, Aldegheri M, Ligozzi M, Lopez H, Sucari A, et al. (1994) Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother 38: 1980-1983.
13. Ligozzi M, Pittaluga F, Fontana R (1996) Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother 40: 354-357.
14. Zorzi W, Zhou XY, Dardenne O, Lamotte J, Raze D, et al. (1996) Structure of the low-affinity penicillin-binding protein 5 PBP5fm in wild-type and highly penicillin-resistant strains of *Enterococcus faecium*. J Bacteriol 178: 4948-4957.

15. Werner G, Fleige C, Ewert B, Laverde-Gomez JA, Klare I, et al. (2010) High-level ciprofloxacin resistance among hospital-adapted *Enterococcus faecium* (CC17). *Int J Antimicrob Agents* 35: 119-125.
16. Hendrickx AP, van Wamel WJ, Posthuma G, Bonten MJ, Willems RJ (2007) Five genes encoding surface-exposed LPXTG proteins are enriched in hospital-adapted *Enterococcus faecium* clonal complex 17 isolates. *J Bacteriol* 189: 8321-8332.
17. Leavis HL, Willems RJ, Top J, Spalburg E, Mascini EM, et al. (2003) Epidemic and nonepidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Emerg Infect Dis* 9: 1108-1115.
18. Rice LB, Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, et al. (2003) A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Infect Dis* 187: 508-512.
19. Damborg P, Sorensen AH, Guardabassi L (2008) Monitoring of antimicrobial resistance in healthy dogs: first report of canine ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clonal complex 17. *Vet Microbiol* 132: 190-196.
20. Top J, Willems R, Blok H, de Regt M, Jalink K, et al. (2007) Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant clonal complex 17 *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect* 13: 316-319.
21. Willems RJ, Top J, van Den Braak N, van Belkum A, Endtz H, et al. (2000) Host specificity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Infect Dis* 182: 816-823.
22. Damborg P, Top J, Hendrickx AP, Dawson S, Willems RJ, et al. (2009) Dogs are a reservoir of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* lineages associated with human infections. *Appl Environ Microbiol* 75: 2360-2365.
23. Ghosh A, Dowd SE, Zurek L (2011) Dogs leaving the ICU carry a very large multi-drug resistant enterococcal population with capacity for biofilm formation and horizontal gene transfer. *PLoS One* 6: e22451.
24. Biavasco F, Foglia G, Paoletti C, Zandri G, Magi G, et al. (2007) VanA-type enterococci from humans, animals, and food: species distribution, population structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants. *Appl Environ Microbiol* 73: 3307-3319.
25. De Leener E, Martel A, De Graef EM, Top J, Butaye P, et al. (2005) Molecular analysis of human, porcine, and poultry *Enterococcus faecium* isolates and their *erm(B)* genes. *Appl Environ Microbiol* 71: 2766-2770.
26. Kwon KH, Moon BY, Hwang SY, Park YH (2012) Detection of CC17 *Enterococcus faecium* in Dogs and a Comparison with Human Isolates. *Zoonoses Public Health* 59: 375-378.
27. Billstrom H, Lund B, Sullivan A, Nord CE (2008) Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents* 32: 374-377.
28. Valenzuela AS, Omar NB, Abriouel H, Lopez RL, Ortega E, et al. (2008) Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food Chem Toxicol* 46: 2648-2652.

29. Hancock LE, Perego M (2004) The *Enterococcus faecalis* fsr two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. J Bacteriol 186: 5629-5639.
30. Heikens E, Bonten MJ, Willems RJ (2007) Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. J Bacteriol 189: 8233-8240.
31. Paulsen IT, Banerjee L, Myers GS, Nelson KE, Seshadri R, et al. (2003) Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Science 299: 2071-2074.
32. Horvath P, Barrangou R (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. Science 327: 167-170.
33. Marraffini LA, Sontheimer EJ (2010) CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. Nat Rev Genet 11: 181-190.
34. Palmer KL, Gilmore MS (2010) Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-*cas*. MBio 1.
35. Tremblay CL, Letellier A, Quessy S, Boulianne M, Daignault D, et al. (2011) Multiple-Antibiotic Resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Cecal Contents in Broiler Chicken and Turkey Flocks Slaughtered in Canada and Plasmid Colocalization of *tetO* and *ermB* Genes. J Food Prot 74: 1639-1648.
36. Garcia-Migura L, Pleydell E, Barnes S, Davies RH, Liebana E (2005) Characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from broiler poultry and pig farms in England and Wales. J Clin Microbiol 43: 3283-3289.
37. Vankerckhoven V, Huys G, Vancanneyt M, Snauwaert C, Swings J, et al. (2008) Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. Appl Environ Microbiol 74: 4247-4255.
38. (Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M31-A3 Vol. 28 No.8.
39. (Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Approved Standard- Twentieth Informational Supplement. CLSI document M 100-S20 Vol. 31 No. 1.
40. Anonymous (2008) Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA). Guelph: Agence de la santé publique du Canada. 66 p.
41. Champagne J, Diarra MS, Rempel H, Topp E, Greer CW, et al. (2011) Development of a DNA microarray for enterococcal species, virulence, and antibiotic resistance gene determinations among isolates from poultry. Appl Environ Microbiol 77: 2625-2633.
42. Diarra MS, Rempel H, Champagne J, Masson L, Pritchard J, et al. (2010) Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus* spp: Characterization of. Isolates from Broiler Chickens. Appl Environ Microbiol.

43. Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB (2000) Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis* 37: 127-137.
44. De Leener E, Martel A, Decostere A, Haesebrouck F (2004) Distribution of the *erm*(B) gene, tetracycline resistance genes, and Tn1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. *Microb Drug Resist* 10: 341-345.
45. Poeta P, Costa D, Saenz Y, Klibi N, Ruiz-Larrea F, et al. (2005) Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal enterococci of wild animals in Portugal. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52: 396-402.
46. Seno Y, Kariyama R, Mitsuhashi R, Monden K, Kumon H (2005) Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Med Okayama* 59: 79-87.
47. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, et al. (1999) Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2823-2830.
48. Nallapareddy SR, Weinstock GM, Murray BE (2003) Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. *Mol Microbiol* 47: 1733-1747.
49. Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, et al. (2004) Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 42: 4473-4479.
50. Jensen LB, Garcia-Migura L, Valenzuela AJ, Lohr M, Hasman H, et al. (2010) A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *J Microbiol Methods* 80: 25-43.
51. Eaton TJ, Gasson MJ (2001) Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 67: 1628-1635.
52. Gaspar F, Teixeira N, Rigottier-Gois L, Marujo P, Nielsen-LeRoux C, et al. (2009) Virulence of *Enterococcus faecalis* dairy strains in an insect model: the role of *fsrB* and *gelE*. *Microbiology* 155: 3564-3571.
53. Zoletti GO, Pereira EM, Schuenck RP, Teixeira LM, Siqueira JF, Jr., et al. (2011) Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. *Res Microbiol* 162: 151-158.
54. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, et al. (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis* 115: 891-899.
55. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG (2000) Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* 13: 686-707.
56. Leener ED, Decostere A, De Graef EM, Moyaert H, Haesebrouck F (2005) Presence and mechanism of antimicrobial resistance among enterococci from cats and dogs. *Microb Drug Resist* 11: 395-403.

57. Ossiprandi MC, Bottarelli E, Cattabiani F, Bianchi E (2008) Susceptibility to vancomycin and other antibiotics of 165 *Enterococcus* strains isolated from dogs in Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31: 1-9.
58. Jureen R, Top J, Mohn SC, Harthug S, Langeland N, et al. (2003) Molecular characterization of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from hospitalized patients in Norway. *J Clin Microbiol* 41: 2330-2336.
59. Brisse S, Fluit AC, Wagner U, Heisig P, Milatovic D, et al. (1999) Association of alterations in ParC and GyrA proteins with resistance of clinical isolates of *Enterococcus faecium* to nine different fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2513-2516.
60. Leavis HL, Willems RJ, Top J, Bonten MJ (2006) High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in *gyrA* and *parC* confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 44: 1059-1064.
61. Valdezate S, Miranda C, Navarro A, Freitas AR, Cabrera JJ, et al. (2012) Clonal outbreak of ST17 multidrug-resistant *Enterococcus faecium* harbouring an Inc18-like::Tn1546 plasmid in a haemo-oncology ward of a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother* 67: 832-836.
62. Jonas BM, Murray BE, Weinstock GM (2001) Characterization of *emeA*, a NorA homolog and multidrug resistance efflux pump, in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 3574-3579.
63. Lee EW, Huda MN, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T (2003) EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3733-3738.
64. Nishioka T, Ogawa W, Kuroda T, Katsu T, Tsuchiya T (2009) Gene cloning and characterization of EfmA, a multidrug efflux pump, from *Enterococcus faecium*. *Biol Pharm Bull* 32: 483-488.
65. Galloway-Pena JR, Nallapareddy SR, Arias CA, Eliopoulos GM, Murray BE (2009) Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. *J Infect Dis* 200: 1566-1573.
66. Low YL, Jakubovics NS, Flatman JC, Jenkinson HF, Smith AW (2003) Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*. *J Med Microbiol* 52: 113-119.
67. Singh KV, Coque TM, Weinstock GM, Murray BE (1998) In vivo testing of an *Enterococcus faecalis efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. *FEMS Immunol Med Microbiol* 21: 323-331.
68. Marothi YA, Agnihotri H, Dubey D (2005) Enterococcal resistance--an overview. *Indian J Med Microbiol* 23: 214-219.
69. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, et al. (2008) NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29: 996-1011.
70. Garcia-Migura L, Hasman H, Jensen LB (2009) Presence of pRI1: a small cryptic mobilizable plasmid isolated from *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *Curr Microbiol* 58: 95-100.

Table 1. Antibiotic resistance of *E. faecium* clinical isolates from humans and dogs based on MICs.

Antibiotic agent	Number of isolates at a MIC (µg/ml) of ^a :																	% resistant isolates (a)	
	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	human	dog
Chloramphenicol								8	1	1								0 (0)	20 (1)
Ciprofloxacin								10										100 (5)	100 (5)
Daptomycin						7	3											0 (0)	0 (0)
Erythromycin						2	2		6									80 (4)	40 (2)
Gentamicin												5				5		60 (3)	40 (2)
Kanamycin											4					6		80 (4)	40 (2)
Lincomycin									10									100 (5)	100 (5)
Linezolid					9	1												0 (0)	0 (0)
Nitrofurantoin										1	8		1					20 (1)	0 (0)
Penicillin				1						9								80 (4)	100 (5)
Streptomycin														4		1	1	4	80 (4)
Quinupristin/ dalfopristin				6	3	1												0 (0)	0 (0)
Tetracycline					4					1	5							40 (2)	80 (4)
Tylosin						3	1				6							80 (4)	40 (2)
Vancomycin				2	5					3								60 (3)	0 (0)
Tigecycline	5	5																0 (0)	0 (0)

^anumber of isolates; |, MIC breakpoint; bold numbers, number of resistant isolates; ||, susceptible breakpoint; unshaded areas, range of dilutions tested; numbers in the shaded area, isolates with MICs greater than the highest tested concentrations.

Table 2. Characterization of *E. faecium* isolates from human and canine enterococcal infections.

Isolate no.	Host ^a	Sources	Phenotypic resistance	Antibiotic and related resistance gene	Virulence gene	Gelatinase and cytolysin activities	Biofilm formation	Rep-family	CRISPR- cas ^b
07-5598	D	Wound	CHL, CIP , ERY, GEN, KAN, LIN , AMP , PEN, STR, TET, TYL	<u>aac(6')-II</u> , tet(M), tet(L), trans, transI	<u>acm</u>	-	-	2, 11, 18	-
M2146-08	D	Bile	CIP , LIN , AMP , PEN, TET	<u>aac(6')-II</u> , tet(M), tet(L), tet(O), msrC, trans, transI, IS150	<u>efaA_{fm}</u> , <u>acm</u>	-	-	2, 6, 11, 14	-
M2971-08	D	Wound	CIP , ERY, GEN, KAN, LIN , AMP , PEN, STR, TET, TYL	<u>aac(6')-II</u> , aadE, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, msrC, tet(M), tet(L), tet(O), trans, transI, IS150	<u>efaA_{fm}</u> , <u>acm</u>	-	-	2, 6, 11	-
M5853-09	D	Urine	CIP , LIN , AMP , PEN, TET	<u>aac(6')-II</u> , msrC, tet(M), tet(L), trans, transI	agg, <u>efaA_{fm}</u> , <u>acm</u>	-	-	2, 6, 11, 14	-
M20638-11	D	Urine	CIP , LIN , AMP , PEN	aac(6')-II, msrC, transI	<u>efaA_{fm}</u> , <u>acm</u>	-	-	6, 11, 14	-
CCRI-18581	H	Anal	CIP , ERY, KAN, LIN , AMP , PEN, STR, TET, TYL, VAN	<u>aac(6')-II</u> , aadE, aph(3')-IIIa, erm(AM), sat(4), erm(B), msrC, tet(M), <u>vanA</u> , vanH, vanR, vanS, vanX, vanY, trans, transI, IS1182, IS150	esp, <u>acm</u>	-	-	11, 14, 17, Unique	-
CCRI-16717	H	Stools	CIP , ERY, GEN, KAN, LIN , AMP , NIT, STR, TET, TYL, VAN	<u>aac(6')-II</u> , aadE, aph(3')-IIIa, erm(AM), erm(B), sat(4), msrC, tet(M), tet(L), <u>vanA</u> , vanH, vanR, vanS, vanX, vanY, res, trans, IS1182	<u>efaA_{fm}</u> , <u>acm</u>	-	-	1, 2, 4, 6, 11	-
CCRI-16354	H	Rectal	CIP , LIN , AMP , PEN, VAN	<u>aac(6')-II</u> , msrC, tet(M), <u>vanB1</u> , trans, transI, IS150	<u>efaA_{fm}</u> , <u>acm</u>	-	-	1, 2, 14	-
CCRI-18707	H	Pus	CIP , ERY, GEN, KAN, LIN , AMP , PEN, STR, TYL	<u>aac(6')-II</u> , aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, aadE, aph(3')-IIIa, erm(AM), sat(4), erm(B), msrC, trans, transI, IS1182, IS150	<u>efaA_{fm}</u> , esp, <u>acm</u> , hyl	-	+	17, Unique	-
CCRI-18231	H	Wound	CIP , ERY, GEN, KAN, LIN , AMP , PEN, STR, TYL	<u>aac(6')-II</u> , aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, aadE, aph(3')-IIIa, erm(AM), erm(B), sat(4), msrC, trans, transI, IS1182, IS150	<u>efaA_{fm}</u> , esp, <u>acm</u> , hyl	-	+++	17, Unique	-

Significant results are in boldface and/or underlined.

^a D, dogs; H, humans^b cas 1, 3 and flanking regions

Table 3. Mutations in *gyrA/B* and *parC* of clinical *E. faecium* isolates with their corresponding ciprofloxacin MIC.

Isolate no.	Amino acid ^a mutation in gene (codon) :			Ciprofloxacin MIC (µg/ml)
	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	
07-5598	Y (83), W (127)	None	I (80)	128
M2146-08	None	None	None	≤ 4
M2971-08	Y (83)	None	I (80)	> 256
M5853-09	None	None	None	8
M20638-11	I (83)	N (436)	R (80)	64
CCRI-18581	Y (83)	None	R (80)	> 256
CCRI-16717	None	None	None	8
CCRI-16354	Y (83)	W (371), S (455)	I (80)	> 256
CCRI-18707	R (83)	None	I (80)	> 256
CCRI-18231	K (87)	None	I (80), D (73)	128

^a D, aspartic acid; I, isoleucine; K, lysine; N, asparagine; R, arginine; S, serine; W, tryptophan; Y, tyrosine.

Figure 1. PFGE types and ST groups of *E. faecium* clinical isolates of canine and human origins. ^aClosest related STs (single locus variant).

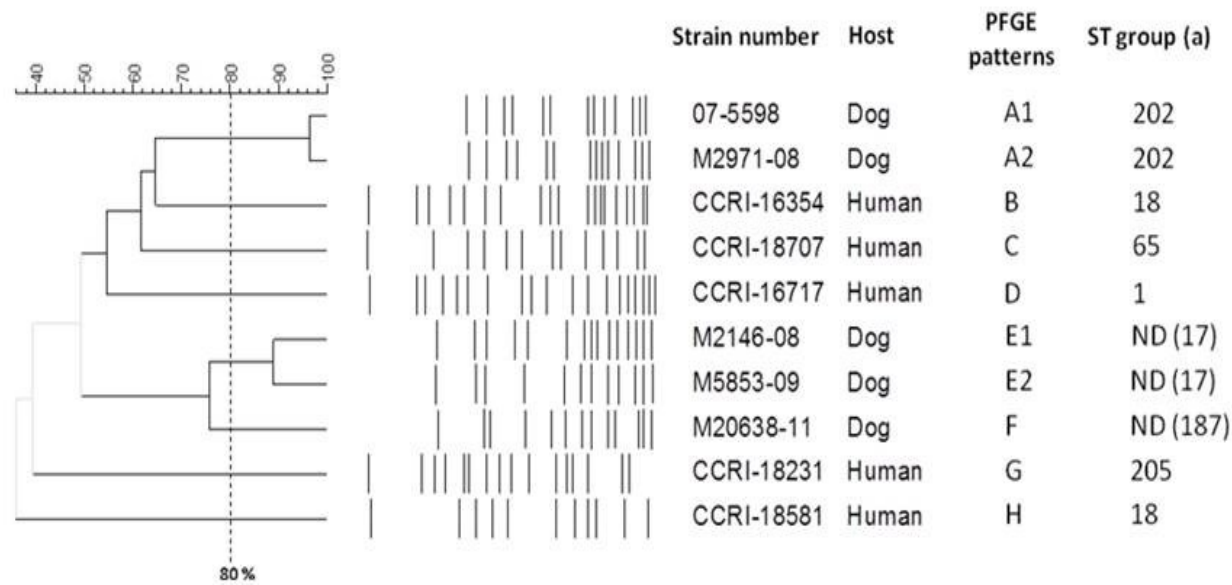
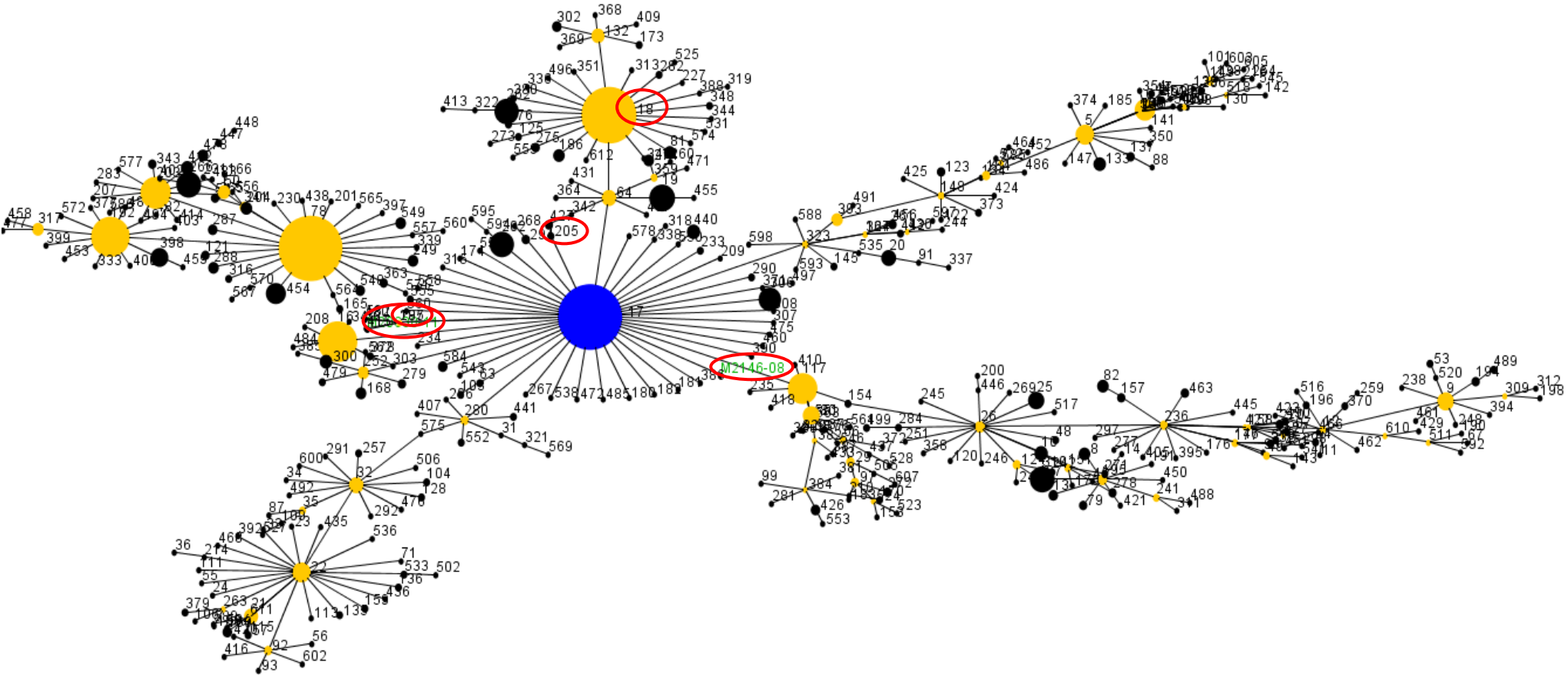


Table S1. PCR primers and products for *rep*-like genes.

Plasmid	Rep-family	Multiplex PCR	Primers (5' to 3') ^a	Product size (bp)	Multiplex T _m	GenBank
pIP501	1		F-TCGCTCAATCACTACCAAGC R-CTTGAACGAGTAAAGCCCTT	624		X17655
pCF10	9	1	F-GCTCGATCARTTTTCAGAAG R-CGCAAACATTTGTCWATTTCTT	201	52	AY855841
pIM13	10		F-TATAAAGGCTCTCAGAGGCT R-CCAAATTCGAGTAAGAGGTA	382		M13761
pMBB1	4		F-ACTATGTCGTTGAGTCTAATGACT R-AGCAAGATAGAATATTTACTTTTAAGTTT	430		U26268
pUSA02	7	2	F-AGACGTAATATGCGTRTTGA R-CCAAAATAYTTYGTTTCTGG	227	52	CP000257
pRI1	14		F-RTTTTGRCTTTCTTSYTTCA R-TGAAAGYTTTGATAGYTTTGC	164		EU327398
pRUM	17		F-TACTAACTGTTGGTAATTCGTTAAAT R-ATCAAGGACTCAACCGTAATT	502		EU376117
pAW63	3	3	F-ACATTTTCCTCAAAGAACAT R-CCTAATGTATATAATTTTGGTACATAT	403	52	AJ011655
pMG1 (pHTβ)	Unique		F-GTATTAACACACTGGACTC R-TCAGTGTAGGCAATAACCC	199		AB206333
pRE25	2		F-GAGAACCATCAAGGCGAAAT R-ACCAGAATAAGCACTACGTACAATCT	630		X92945
pS86	6	4	F-ACGAATGAAAGATAAAGGAGTAG R-TAAATTCTAGTTTGGCAATCTTAT	551	56	AJ223161
pAM373	8		F-CCAATCATGTAATGTTACAACC R-TAGATACGACAAAAGAAGAATTACA	394		AE002565
pEF418	18		F-ACACCAGTCGAAATGAATTT R-AGGAATATCAAGTAATTCATGAAAGT	462		AF408195
pC194	13		F-TACCAGAATAYTTAGCCATTTT R-ATGATGCAATATATTAAGCA	402		V01277
pUSA03	15	5	F-CAGTAGAAGAAAATTATAAAGAAC R-GTTATGGCTGGTTTAAATAAA	327	54	CP000258
pSAS	16		F-CTTCTATATCACTATCATTGTCATT R-CAGGAAAACACTTCGTTTAT	592		BX571858
pSAS	5	6	F-ATGTGTAATAAAATTAAAAGAGCA R-ATTGTCTTGATTTATCTATCTTG	637	54	BX571858
pN315				615		AP003139
pEF1071	11		F-TCTAGAATGCGTGAAAAAGG R-CCTTTGAAGATWGCRGTWAG	500		AF164559
pUB101	19	Unique	F-AMTTCTTSGAGTAGTATTTC R-GWGATCGCTTARAYTTATCTAT	540	52	AY373761

^a F, Forward; R, Reverse.

Figure S1. eBURST-based population snapshot of *E. faecium* CC17 based on 612 STs representing 1993 isolates contained in the online *E. faecium* MLST database (www.e faecium.mlst.net). STs belonging to our clinical *E. faecium* isolates related to CC17 are red circled.



IV. DISCUSSION

Ce projet de recherche portait sur l'évaluation de la résistance phénotypique et génotypique aux antibiotiques chez les entérocoques aviaires et porcins ainsi que sur les éléments génétiques mobiles impliqués dans le phénomène de co-sélection. Il consistait également à détecter un plasmide répondant aux phéromones et codant pour de la résistance aux antibiotiques afin d'évaluer si l'utilisation d'un antisérum Agg polyclonal diminuerait le transfert horizontal des gènes. De plus, une analyse comparative de souches cliniques humaines et canines a été réalisée. Ce projet de recherche a été effectué grâce à l'utilisation de techniques phénotypiques et génotypiques.

La discussion des résultats obtenus dans cette thèse est divisée en cinq sections principales : 1) Résistance phénotypique aux antibiotiques; 2) Résistance génotypique aux antibiotiques; 3) Prévalence de la résistance aux antibiotiques : analyse de bactéries indicatrices versus analyse métagénomique; 4) Évaluation de l'antisérum Agg polyclonal dans le blocage ou la diminution du transfert des gènes de résistance aux antibiotiques; et 5) Analyse comparative de souches cliniques humaines et de petits animaux.

1. Résistance phénotypique aux antibiotiques

a. Isolats aviaires et porcins

La volaille est un des types de viande les plus consommés. En 2009, la production des produits avicoles du Canada s'élevait à 3 milliards de dollars. La même année, le Canada a produit 1 milliard de kilogrammes de poulet, dont 60% au Québec et en Ontario. Dans l'ensemble, le Canadien moyen a consommé 36.9 kg de poulet et de dindon dont 31.3 kg de poulet par personne annuellement [431]. La volaille est également un véhicule important de la transmission d'agents pathogènes d'origine alimentaire [432]; entre autres d'entérocoques résistants aux antibiotiques notamment envers la tétracycline, les macrolides, les lincosamides et les streptogramines. La production porcine canadienne a connu une évolution phénoménale. Il y a trente ans, la majorité des porcs étaient élevés dans de petites fermes mixtes d'environ 50 têtes par année. Celles-ci ont cédé la place à de grandes fermes de 500 truies et plus, produisant plus de 10 000 porcs par an. Aujourd'hui, les plus grandes porcheries produisent 28 000 porcs annuellement. Avec des revenus à la ferme de plus de 3 milliards de dollars

canadiens, l'industrie porcine représente près de 30% des revenus engendrés par les productions animales et 10% de tous les revenus des producteurs agricoles du pays [433]. Depuis 2002, le Québec a dû faire face à une succession de lourdes crises sanitaires dues au circovirus et au syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (SDRP). Lors de ce contexte sanitaire (2005-2006), une étude sur l'usage des antibiotiques en production porcine au Québec a été effectuée. Une épidémie de maladie associée au circovirus porcin affectait plus de 50% des troupeaux de porcs durant cette étude. Cette épidémie de maladie a entraîné une utilisation plus importante des antibiotiques dont celle au niveau de la prévention des maladies (www.cdpq.ca).

L'utilisation des antibiotiques a été identifiée comme l'un des premiers facteurs associés à la résistance aux antibiotiques, ce qui a engendré plusieurs débats concernant leur utilisation chez les animaux de consommation [14, 265]. De plus, il a été démontré que malgré l'absence de pression de sélection par des antibiotiques, la résistance, et même la multirésistance, pouvait continuer à se développer, se maintenir et se disséminer chez les microorganismes. Puisque les entérocoques peuvent survivre dans l'environnement pendant de longues périodes et qu'ils sont parmi les plus thermotolérants des bactéries non-sporulantes, la contamination des contenants de transport des animaux par des entérocoques résistants aux antibiotiques apporte un risque de transfert de ces bactéries à d'autres lots et, indirectement, aux produits de viande [30]. De plus, les installations d'attente dans les abattoirs constituent d'importantes sources de contamination, par des microorganismes opportunistes et/ou résistants aux antibiotiques, dans la chaîne de production des animaux de consommation (www.omafra.gov.on.ca).

Au Canada, nous avons un système de surveillance de la résistance aux antimicrobiens qui publie des rapports descriptifs depuis 2002. Au fil des ans, ce système s'est adapté en ajustant les antibiotiques testés et leur valeur seuil de résistance ainsi qu'en ajoutant différents échantillonnages chez le porc et la volaille. Malgré tout, il n'existe pas encore de données sur la résistance phénotypique des entérocoques isolés à l'abattoir. Les seules données disponibles proviennent d'échantillons de viande de poulet et des matières fécales des porcs à la ferme [400].

Cette étude estime la fréquence des entérocoques multirésistants aux antimicrobiens dans les abattoirs de volaille et de porcs du Québec. *E. faecalis* a été détecté comme espèce dominante (69.8 % des isolats) tant chez la dinde que le poulet, ce qui est semblable à certaines études [57, 434] mais en contraste avec d'autres indiquant *E. faecium* comme espèce dominante chez le poulet [435, 436]. Les deux espèces comptaient pour une grande proportion (74%) des isolats d'entérocoques de la volaille dans cette étude. Tel que pour la volaille, *E. faecalis* a également été retrouvé comme l'espèce prédominante (89.9%) isolée des échantillons de ceca de porc, ce qui semble similaire à d'autres études [325, 385] mais étant contraire à une autre où il est mentionné qu'*E. faecium* est l'espèce la plus isolée du porc [64]. Ces variations dans l'occurrence de l'espèce sont probablement dues en partie à l'origine des échantillons. Par exemple, les résultats similaires proviennent d'échantillons du colon des porcs à l'abattoir, tandis que les résultats différents proviennent directement des fèces. Il a été démontré que l'espèce *E. faecalis* était isolée jusqu'à 46% dans les intestins du porc versus 23% pour *E. faecium*. Tandis que dans les fèces, c'est l'inverse, on retrouve 50% d'isolats *E. faecium* comparativement à seulement 6% d'isolats *E. faecalis* [437].

Les données regroupant la résistance phénotypique révèlent qu'un grand nombre d'entérocoques d'origines aviaire et porcine étaient résistants à différentes classes d'antibiotiques et que le pourcentage d'isolats résistants à ces classes était relativement élevé (Figures 1 et 2). Il est à noter que les résistances à la lincomycine et à la quinupristine/dalfopristine chez *E. faecalis* ne sont pas prises en compte, puisque cette espèce y est résistante de façon intrinsèque. De par ce fait, seulement les isolats *E. faecium* de la volaille étaient résistants à au moins trois antimicrobiens ou classes d'antibiotiques, mais de nombreux phénotypes de multirésistance ont été observés dans les deux espèces (*E. faecalis*, $n = 42$ et *E. faecium*, $n = 65$). Étant donné le faible nombre d'isolats identifiés en tant qu'espèce *E. faecium* chez le porc, les résistances n'ont pas été prises en compte. Plusieurs phénotypes de multirésistance ont malgré tout été observés chez *E. faecalis* ($n = 23$). Par contre, si l'on compare aux isolats de la volaille, le nombre de phénotype est beaucoup moins élevé. Il est également décrit que les souches isolées de la volaille démontrent une très grande variabilité des phénotypes de

résistance aux antibiotiques [409]. En général, la résistance observée chez les isolats d'entérocoques de la volaille et du porc reflète les pratiques locales en production animale et les antibiotiques disponibles commercialement et favorisés au Canada [279], avec quelques différences notables telles que discutées précédemment.

Figure 1. Profil de résistance aux antibiotiques des entérocoques isolés de ceca de poulet et de dinde du Québec (adapté de [438]).

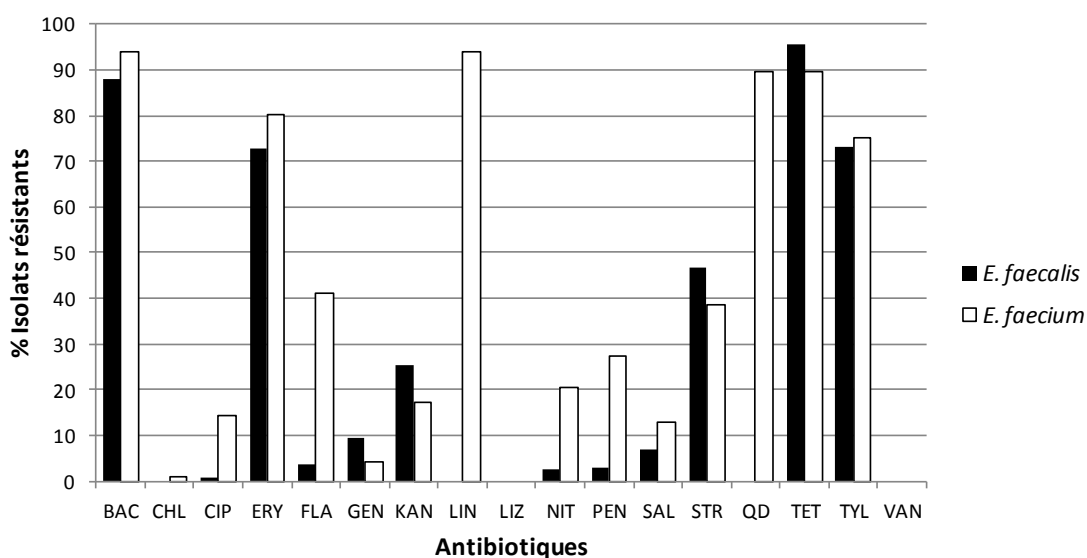
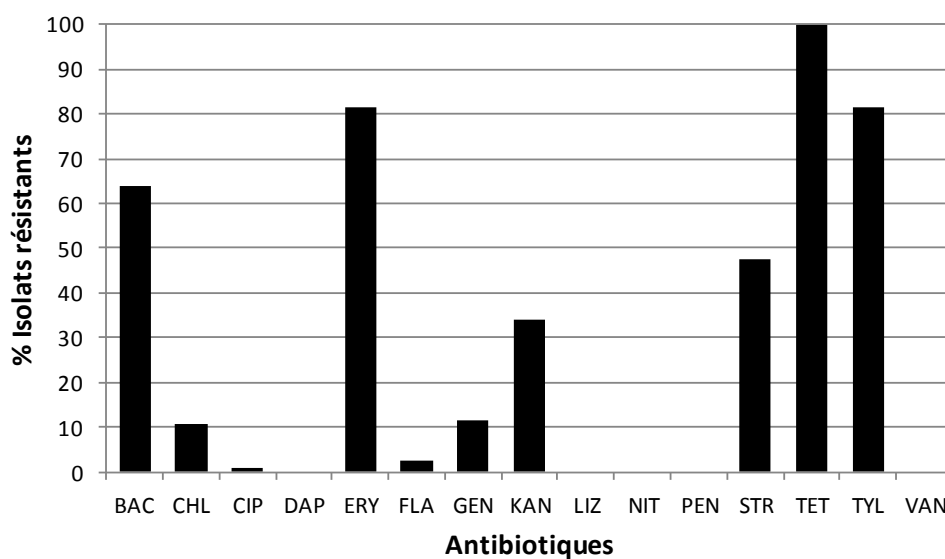


Figure 2. Profil de résistance aux antibiotiques des *E. faecalis* isolés de ceca de porc du Québec (adapté de [439]).



Il est également intéressant de comparer les patrons de résistance avec les résultats obtenus par le système de surveillance du PICRA (Tableaux I, IIa et IIb).

Tableau I. Nombre d'antimicrobiens dans les patrons de résistance par espèce chez la volaille.

Espèce	Nombre d'antimicrobiens dans le patron de résistance				
	0	1	2-5	6-9	10-13
Pourcentage d'isolats					
Échantillons viande de poulet du Québec et de l'Ontario (rapport PICRA 2004)					
<i>E. faecalis</i> (n = 295)	4	13	70	14	-
<i>E. faecium</i> (n = 11)	-	-	72	27	-
Échantillons viande de poulet du Québec et de l'Ontario (rapport préliminaire PICRA 2009)					
<i>E. faecalis</i> (n = 277)	9	32	59	-	-
<i>E. faecium</i> (n = 5)	-	20	20	60	-
Cecums échantillonnés abattoirs dinde et poulet du Québec (cette étude, 2003-2004)					
<i>E. faecalis</i> (n = 270)	-	1	70	28	-
<i>E. faecium</i> (n = 117)	-	-	21	66	12

Si l'on compare les résultats de la volaille avec ceux des rapports 2004 ou 2009 du PICRA, on peut observer un certain décalage dans le nombre d'antimicrobiens présents dans le patron de résistance, principalement chez l'espèce *E. faecium*, se résumant à une multirésistance plus élevée dans cette étude. Cette multirésistance plus élevée semble être expliquée par les différences dans les valeurs seuils de résistance envers quatre antibiotiques dans le rapport de 2004. Malgré l'année d'échantillonnage dans la présente étude, les valeurs seuils de résistance étaient celles reflétant l'année actuelle. Ainsi, au cours des dernières années, celles-ci étaient plus élevées envers quatre antibiotiques (KAN, BAC, FLA, SAL) lors de la compilation des résultats du rapport du PICRA 2004. Pour ce qui est du rapport préliminaire du PICRA 2009, malgré l'ajout d'un antibiotique, soit la tigécycline, aucune résistance n'a été rapportée. De plus, la bacitracine et la flavomycine ne sont plus testées. Ces différences semblent également expliquer le décalage des résultats avec ceux du rapport de 2009. Ces observations sont aussi reflétées dans les profils prédominants des rapports et ceux ayant le plus grand nombre de résistance. Dans le tableau I, seulement les résultats des provinces du Québec

et de l'Ontario sont montrés pour le rapport de 2009 afin de mieux comparer avec ceux du rapport de 2004. Ainsi, selon les résultats de notre étude, il semble y avoir une certaine sous-estimation de la multirésistance détectée dans les isolats aviaires du Québec. Une autre différence importante est à noter, soit le nombre d'isolats identifiés en tant qu'*E. faecium*. Celui-ci est beaucoup moindre dans les rapports que dans notre étude. L'explication provient fort probablement dans la provenance des échantillons, c'est-à-dire la viande au détail concernant les rapports du PICRA, contrairement à notre étude où les cecums ont été prélevés. La méthode d'isolement bactérien utilisée est similaire à celle faite dans notre étude. Il est certain que d'observer la résistance aux antimicrobiens à partir d'échantillons de la viande au détail est davantage intéressant d'un point de vue santé publique, puisque c'est celle-ci qui entrera directement en contact avec la communauté et qui reflète un portrait des manipulations entre l'abattoir et l'assiette du consommateur. D'un autre côté, le suivi de cette résistance à l'abattoir est également très intéressant puisqu'il démontre les possibilités de contamination croisée. Les étapes associées à la contamination entre la ferme et la carcasse à l'abattoir sont nombreuses. Elles incluent, entre autres, le parc d'expédition à la ferme, le transport, le parc d'attente à l'abattoir et l'environnement d'abattage. Lorsque l'on peut suivre la provenance des échantillons, c'est-à-dire voir ce qui se passe à la ferme (utilisation antibiotiques) versus la flore résiduelle post-abattage, on peut ensuite déterminer l'origine possible de la résistance ou des clones résistants, par des méthodes moléculaires.

Tableau IIa. Nombre d'antimicrobiens dans les patrons de résistance des isolats *E. faecalis* chez le porc.

Espèce	Nombre d'antimicrobiens dans le patron de résistance			
	0	1 - 4	5 - 8	9 - 15
Pourcentage d'isolats				
Fèces échantillonnées des porcs à la ferme en Alberta, Saskatchewan, Manitoba, Ontario et Québec (rapport PICRA 2006)				
<i>E. faecalis</i> (n = 642)	4	59	38	-
Cecums échantillonnés abattoirs porcs du Québec (cette étude, 2005)				
<i>E. faecalis</i> (n = 124)	-	60	40	1

La surveillance au Canada de la résistance aux antimicrobiens, chez les entérocoques du porc, n'a débuté qu'en janvier 2006. Les échantillons provenaient des fèces de porc à la ferme et couvraient les provinces de l'Alberta, la Saskatchewan, le Manitoba, l'Ontario et le Québec [255]. Dans notre étude, les échantillons provenaient de cecums de porc à l'abattoir et seulement dans la province du Québec au cours de l'année 2005. Contrairement à la volaille, on peut voir que la distribution des patrons de résistance de cette étude est similaire à celle du rapport du PICRA 2006 (Tableau IIa). Comparativement aux données préliminaires du rapport de 2009 (Tableau IIb), nos résultats démontrent un plus fort pourcentage d'isolats ayant un plus grand nombre de résistances. Une des raisons pourrait être due au changement de plaque Sensititre utilisée pour tester la susceptibilité des isolats, puisque dans cette dernière, la bacitracine n'y est plus (plaque CMV2AGPF). Effectivement, si l'on observe les profils prédominants de multirésistance dans notre étude, on peut noter la présence de la bacitracine versus son absence dans ceux des rapports du PICRA 2006 et 2009. Par contre, une autre raison probable de ce décalage est l'origine des échantillons. Plus précisément, ceux provenant des matières fécales de porc à la ferme ont une plus faible possibilité de contamination croisée avec des contaminants provenant d'autres fermes, tel qu'observé à l'abattoir. Ceci peut donc résulter en une moins grande diversité des phénotypes de multirésistance détectés.

Tableau IIb. Nombre d'antimicrobiens dans les patrons de résistance par espèce chez le porc.

Espèce	Nombre d'antimicrobiens dans le patron de résistance				
	0	1	2-5	6-9	10-13
Pourcentage d'isolats					
Fèces échantillonnées des porcs à la ferme en Alberta, Saskatchewan, Manitoba, Ontario et Québec (rapport préliminaire PICRA 2009)					
<i>E. faecalis</i> (n = 1250)	4	15	80	-	-
Cecums échantillonnés abattoirs porcs du Québec (cette étude, 2005)					
<i>E. faecalis</i> (n = 124)	-	2	68	31	-

La forte prévalence de la multirésistance observée au cours de notre étude ajoute un questionnement sur l'utilisation des antibiotiques en production porcine et aviaire au

Québec. Une de ces utilisations, étant toujours controversée, est l'emploi des antibiotiques en tant que promoteur de croissance. Un peu plus de 24 et 41 % des antibiotiques testés dans notre étude, chez le porc et la volaille respectivement, sont connus pour leur utilisation, en partie, en tant que promoteur de croissance au Canada. Une moyenne de 54 % des isolats étaient résistants à cette catégorie d'antibiotiques. Selon une enquête réalisée par épidémio-qualité (2006) [440], la proportion d'antibiotiques employés comme facteurs de croissance, comparativement aux usages prophylactiques et curatifs, serait de l'ordre de 24 % (du nombre total de prescriptions), représentant 5 % du volume total des agents antimicrobiens donnés aux animaux. En général, les performances zootechniques pourraient atteindre de 3 à 10 % [440]. Toutefois, tel qu'observé chez les porcins, le gain est plus important chez des groupes d'animaux ayant un statut sanitaire qualifié de « traditionnel », comparativement aux troupeaux dits « assainis » [384]. Un troupeau est qualifié de « traditionnel » si les élevages sont contaminés par diverses bactéries et virus ayant le potentiel de causer une maladie chez ces animaux. Un troupeau « assaini » est exempt de la plupart des maladies infectieuses importantes. Un rapport émit par le Centre de développement du porc du Québec (CDPQ) a montré que les effets bénéfiques étaient faibles, soient moins de 3 % de gain moyen quotidien et de conversion alimentaire (<http://www.cdpqinc.qc.ca/>). Des porcs à l'étape de croissance-finition issus d'un groupe dit à statut sanitaire traditionnel et d'un autre à statut sanitaire dit assaini ont été suivis pendant trois mois [440]. Pour chacun des statuts sanitaires, il y avait un groupe témoin, alors que l'autre groupe recevait de la tylosine et de la salinomycine. La conclusion de l'étude suggère que l'utilisation des antibiotiques en tant que facteurs de croissance n'améliore pas les performances de croissance de façon suffisamment importante pour justifier leur usage chez les porcs en statut sanitaire traditionnel [384]. Par contre, ils n'ont pas pu mettre en évidence que l'usage des antibiotiques comme facteurs de croissance dans un seul lot pouvait créer une pression suffisante pour sélectionner des souches résistantes.

Cet usage mérite tout de même d'être remis en question de par ces différents résultats; et davantage d'études devraient être effectuées afin de mieux convaincre les gens de l'industrie à s'interroger sur ce type d'utilisation. Dans ce sens, malgré l'absence

d'action définitive, la FDA (US Food and Drug Administration) a récemment fait des progrès dans cette direction. Officiellement, l'organisation supporte la conclusion énonçant que l'utilisation des antibiotiques médicalement importants à des fins non-thérapeutiques en production animale ne protège ni ne promouvoit la santé publique [441]. Sans trop de contraintes, un document lancé en 2010 recommande des mesures de mise en place progressive limitant l'utilisation de ces antibiotiques chez les animaux et qui pourraient donc ultimement aider à réduire la pression de sélection qui cause et maintient la résistance aux antibiotiques [442]. Afin de répondre à la restriction proposée, la FDA travaille à faire enlever la revendication de facteur de croissance sur les antibiotiques médicalement importants. Cela signifierait que l'administration de ces produits à des fins de production animale cessera puisqu'il n'y aura pas d'utilisation légale dite « hors étiquette » de ces antibiotiques. Les produits resteront par contre disponibles pour le contrôle, la prévention ou le traitement pour toutes indications à la dose, la durée et la fréquence décrites sur l'étiquette. La FDA a également établi qu'un vétérinaire devra être impliqué dans le processus d'application.

2. Résistance génotypique aux antibiotiques

a. Isolats aviaires et porcins

Un des problèmes importants est le potentiel de développement et d'amplification des gènes de résistance aux antimicrobiens via le transfert horizontal d'éléments génétiques codant pour celle-ci [443]. Ce type de transfert peut prendre également place dans divers environnements, incluant à la ferme où les animaux sont traités à l'aide d'antibiotiques, sélectionnant ainsi les bactéries résistantes qui pourraient être transmises à l'homme via les aliments contaminés [265]. Au Canada, il n'y a qu'une seule étude récente qui a publié des informations relatives aux gènes de résistance aux antibiotiques portés par des entérocoques isolés de neuf fermes commerciales de poulet en Colombie-Britannique [264]. De plus, n'ayant pas observé d'étude à grande échelle sur la caractérisation génotypique de la résistance chez le porc au Canada, une seule autre étude a publié des informations relatives aux gènes de résistance aux antibiotiques portés par des entérocoques isolés de fèces de porc aux États-Unis [265]. Finalement, il y a peu d'études faites sur les éléments génétiques mobiles, retrouvés chez les

entérocoques, impliqués dans le phénomène de co-sélection de la résistance aux antibiotiques au Canada.

Globalement, il a été observé qu'un phénotype donné de multirésistance aux antibiotiques pouvait être associé à plusieurs combinaisons de différents gènes de résistance. Chez la volaille, le phénotype de résistance bacitracine, macrolide-lincosamide-streptogramine B, quinupristine/dalfopristine, tétracycline étaient le plus souvent associés aux gènes *bcrB*, *erm*(B) et *tet*(M) respectivement. Tandis que pour les isolats du porc, les résultats indiquent que les phénotypes de résistance envers les macrolides, lincosamides, streptogramines B, tétracyclines, kanamycine et la streptomycine sont associés le plus souvent aux gènes *erm*(B), *tet*(M), *aph*(3')-IIIa et *aadE*, respectivement. Dans l'ensemble, les gènes *erm*(B) et *tet*(M) étaient les plus communément observés. Pour la première fois, la colocalisation plasmidique et le transfert conjugatif des gènes *erm*(B)/*tet*(O) chez des isolats d'*E. faecalis* aviaires et des gènes *erm*(B)/*tet*(M) chez des isolats *E. faecalis* porcins ont été démontrés, indiquant que la co-sélection antimicrobienne et la transférabilité sont possibles via ces deux éléments génétiques. Également, les résultats indiquent que les entérocoques intestinaux de la volaille et du porc en santé, qui peuvent contaminer la viande à l'abattoir, pourraient représenter un réservoir de gènes de résistance envers la quinupristine/dalfopristine, la bacitracine, les aminoglycosides (à de fortes concentrations), la tétracycline et les macrolides.

Une étude précédente a indiqué que les entérocoques aviaires sont habituellement génétiquement différents, mais avec peu de clonalité [436]. Afin de s'en assurer, la technique du Rep-PCR a été utilisée sur certains isolats aviaires des deux profils prédominants provenant d'un même « pool » (contenu cecal d'environ 10 oiseaux). Cette technique permet l'amplification de nombreux fragments de tailles différentes représentant l'ADN au sein de séquences répétitives non-codantes du génome [444]. La moitié de ces isolats étaient clonaux avec le même profil de gènes de résistance aux antimicrobiens. Cependant, 45 % étaient clonaux par Rep-PCR, mais différaient par leurs gènes de résistance aux antibiotiques. Ainsi, dans cette étude, l'évaluation de la

clonalité des isolats multirésistants fut préférablement effectuée par l'utilisation du Rep-PCR et d'une analyse moléculaire de la résistance aux antimicrobiens. Autrement, quelques gènes de résistance auraient été négligés.

Notre étude démontre l'absence de gènes de résistance à la vancomycine. Par contre, le gène de résistance à la quinupristine/dalfoprastine, *vat(D)*, a été observé tant chez l'espèce *E. faecalis* qu'*E. faecium* des isolats aviaires. Tel que mentionné précédemment, l'espèce *E. faecalis* est résistante intrinsèque aux streptogramines A et malgré ce fait, six isolats ont démontré la présence du gène *vat(D)*. Encore plus intéressant, la présence de ce gène correspond à l'observation d'une CMI plus élevée chez tous ces isolats d'*E. faecalis* aviaires ($\geq 32 \mu\text{g/ml}$). Aucune de ces souches ne possédaient le gène *vat(E)*. Cependant, des souches *E. faecalis* avec le gène *vat(E)*, provenant d'échantillons de volaille au détail aux États-Unis, ont récemment été décrites en tant que réservoir de résistance aux streptogramines chez l'homme et en tant que problème potentiel de santé publique (infections nosocomiales) [445].

Tel que mentionné précédemment, la prévalence des résistances à des concentrations élevées envers la kanamycine et la streptomycine était beaucoup plus élevée que celle envers la gentamicine. Puisque les aminoglycosides sont considérés comme des antibiotiques de premier choix dans le traitement des infections à entérocoques, en combinaison avec des antibiotiques agissant sur la paroi cellulaire, la possibilité de dissémination des gènes conférant la résistance à de fortes doses envers les aminoglycosides chez les entérocoques via la chaîne alimentaire peut être problématique [446]. La résistance à la pénicilline était plus faible que celle envers la streptomycine bien que la pénicilline soit rapportée comme étant souvent utilisée seule ou en combinaison avec la streptomycine en production aviaire et porcine au Canada [279]. Ces deux antibiotiques ont un effet synergique bactéricide qui dépend de deux processus : l'habileté de la streptomycine d'interagir avec le ribosome bactérien, perturbant sa fonction, tandis que la pénicilline est un antibiotique agissant sur la paroi cellulaire, facilitant la streptomycine d'atteindre sa cible. La question sur l'effet qu'une résistance aux bêta-lactamines peut avoir sur la résistance à la streptomycine est intéressante, mais complexe. Il est tentant de suggérer que lorsqu'un microorganisme

devient résistant aux bêta-lactamines, moins d'aminoglycosides sont capables d'entrer dans la cellule afin d'atteindre leur cible ribosomale. Ainsi, on pourrait s'attendre que l'effet synergique soit perdu ou diminué. Inversement, il est rapporté que l'activité synergique de la combinaison pénicilline/aminoglycoside est abolie lorsqu'il y a de la résistance élevée face aux aminoglycosides et que cette suppression apparaîtrait également lorsque l'enzyme, codé par le gène de résistance, est faiblement affecté par l'aminoglycoside en question [447]. À ce jour, il n'y a aucun gène commun, décrit dans la littérature, conférant de la résistance aux deux classes d'antibiotiques.

La résistance à la tétracycline a été expliquée chez tous les isolats à l'étude, à l'exception d'un seul chez la volaille, par la présence des gènes *tet(M)* et/ou *tet(O)*, qui sont fréquemment rapportés [385]. Des éléments génétiques mobiles ont été associés aux résistances aux macrolides et aux tétracyclines chez les entérocoques et une revue les concernant a récemment été publiée [29]. Puisqu'il est bien connu que ces gènes peuvent être co-localisés sur des transposons membres de la famille Tn916/Tn1545-like, les isolats négatifs pour le gène de l'intégrase de cette famille ont été sélectionnés pour de plus amples analyses. Ainsi, neuf isolats *E. faecalis* de la volaille ont démontré la présence d'un plasmide de faible poids moléculaire de 11 kb avec les gènes *erm(B)/tet(O)* et six isolats *E. faecalis* du porc avec les gènes *erm(B)/tet(M)* sur un plasmide de 9 kb. Trois et quatre de ces isolats, respectivement, ont démontré la capacité de transfert de ces plasmides vers la souche réceptrice *E. faecalis* JH2-2. Il semble que ce soit la première fois que ces gènes se retrouvent sur des plasmides de faible poids moléculaire chez des entérocoques de la volaille et du porc, respectivement. Le gène *tet(O)* a rarement été retrouvé chez les entérocoques et il a été détecté sur de larges plasmides structurellement reliés [448]. Les éléments génétiques codant pour les deux gènes *erm(B)* et *tet(M)* sont habituellement de tailles allant de 25 kb à 65 kb [29]. Cette colocalisation a également été observée chez l'espèce *Streptococcus pyogenes* sur des éléments génétiques allant de 21 kb à au-delà de 50 kb [449]. Une étude récente a démontré une association entre la taille d'un plasmide et sa mobilité [450]. Le système de classification des plasmides en termes de mobilité a démontré que les plasmides conjugatifs étaient d'une taille moyenne de 100 kb, tandis que les plasmides

mobilisables étaient en moyenne de 5 kb et une faible proportion était d'environ 150 kb. Également, ils ont rapporté que le plus petit plasmide conjugatif putatif retrouvé chez les protéobactéries était de 21.8 kb (pCRY de *Yersinia pestis*). Ce plasmide était très homologue à ceux étant conjugatifs. Ainsi, le faible poids moléculaire des deux plasmides de cette étude suggère la présence de plasmides non-conjugatifs nécessitant la mobilisation par un élément conjugatif co-résident [451]. De plus, les familles de plasmides *Rep* ont été détectées afin de mieux caractériser l'éventail d'hôtes dans lesquels le plasmide de 9 kb pouvait se disséminer et/ou quel autre plasmide co-résident pouvait permettre son transfert [341]. La famille de plasmide *rep₉* a été détectée dans les souches porcines et leurs transconjuguants respectifs, ce qui pouvait apporter l'hypothèse que le plasmide de 9 kb pouvait faire partie de cette famille. Cette famille de plasmide est associée à un éventail d'hôtes très restreint puisqu'elle n'a été rapportée que chez *E. faecalis*, et quelques exceptions chez *E. faecium* [341]. En fait, cette éventualité semble très peu probable puisque la famille *rep₉* est habituellement composée des plasmides répondant aux phéromones dans lesquels le plus petit ayant été décrit était de 36.7 kb (pAM373) [452]. Ainsi, l'association entre le plasmide de 9 kb retrouvé chez les souches *E. faecalis* porcines avec les familles de plasmides *Rep* requière une analyse plus approfondie. Dans une étude précédente, un plasmide de 8 kb (pSES20), isolé d'une souche *Staphylococcus lentus*, a été séquencé et a démontré la présence d'une partie du transposon Tn917-like et d'un gène presque identique à *erm*(B) ainsi que sa région régulatrice [453]. Il serait donc intéressant de penser que les plasmides de 11 kb et 9 kb de notre étude seraient composés, en partie, de différents transposons tels que Tn917 (*erm*(B)) [454] et Tn916 (*tet*(M)) [455] ou de plasmides tels que pIP1433 (*tet*(O)) [448]. Dans notre étude, des réplicons (familles de plasmide) non-spécifiques, obtenus d'une souche donneuse et d'un transconjuguant *E. faecalis* porcin, ont été séquencés et ont résulté en une homologie de 94 % avec des régions des transposons Tn916 et Tn916-like retrouvées chez les espèces *Streptococcus* et *Enterococcus*, respectivement. De plus, le produit PCR de la région au-delà du gène *tet*(M) a résulté en une homologie de 76 % avec différentes régions du transposon Tn916 de streptocoques et avec des régions de Tn916-like d'entérocoques. Ainsi, il est tentant

de spéculer que le plasmide de 9 kb serait composé de parties de différents transposons tels que le Tn916 ou Tn916-like.

Donc, la possibilité de dissémination via la chaîne alimentaire de ces plasmides, associés aux résistances aux macrolides et aux tétracyclines chez les entérocoques, est très préoccupante. Ils ajoutent une charge supplémentaire aux séquences déjà bien connues et propagées étant reliées aux éléments génétiques Tn916/Tn1545, Tn5397, CW459TetM/Tn5801 et CTn6000 chez les entérocoques de différentes origines [29]. De plus, l'utilisation des macrolides pourraient maintenir la résistance aux tétracyclines en productions aviaires et porcines grâce au processus de co-sélection, et vice-versa.

Un dernier point intéressant concerne la résistance à la bacitracine chez les isolats du porc. La résistance acquise à la bacitracine chez *E. faecalis* est codée par un transporteur ABC (BcrAB) et une protéine régulatrice, BcrR [392]. Les gènes *bcrR* et *bcrB* étaient les seuls gènes de résistance à la bacitracine détectés chez les isolats porcins de notre étude. De plus, chez la plupart des isolats, aucun gène *bcr* n'a été observé. Ainsi, les résultats laissent suggérer la présence d'un autre mécanisme de résistance envers la bacitracine. Les possibilités laissent suggérer deux mécanismes de résistance à la bacitracine décrits chez les bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif. Le gène *bacA* d'*E. coli* a été le premier décrit en 1992. BacA a récemment été renommé UppP, une undécaprényl pyrophosphate phosphatase, laquelle génère une undécaprényl monophosphate (UP) à partir d'une UPP contribuant ainsi à la résistance envers la bacitracine. Des homologues à *bacA* ont également été identifiés chez d'autres bactéries telles que *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus* et dans le génome d'*E. faecalis* V583 [456]. Un second mécanisme de résistance, rapporté chez *Xanthomonas campestris*, *Sphingomonas* sp., *E. coli* et *S. mutans*, dépend de la production d'exopolysaccharides lesquels diminuent l'entrée de la bacitracine dans la cellule [457].

En conclusion, les données obtenues démontrent la présence de deux plasmides nouvellement décrits de faible poids moléculaire démontrant une colocalisation et un co-transfert des gènes *erm(B)/tet(O)* et *erm(B)/tet(M)* chez des isolats *E. faecalis* aviaires et porcins, respectivement. Ceci illustre la possibilité d'une co-sélection et d'un co-

transfert des résistances aux macrolides et aux tétracyclines via ces deux éléments génétiques mobiles. Finalement, les résultats indiquent que les entérocoques provenant de la volaille et des porcs sains à l'abattoir peuvent représenter un réservoir de gènes de résistance à la quinupristine/dalfopristine, à la bacitracine, aux aminoglycosides (à de fortes concentrations), aux tétracyclines et aux macrolides.

3. Prévalence de la résistance aux antibiotiques : analyse de bactéries indicatrices versus analyse métagénomique

Lorsque l'on veut déterminer la prévalence de la résistance aux antibiotiques dans la population bactérienne commensale ou potentiellement pathogène d'un hôte, on utilise des bactéries dites indicatrices de la résistance comme représentantes de cette communauté. Ces bactéries doivent posséder des caractéristiques particulières, dont la capacité d'acquérir et de disséminer facilement de multiples résistances aux antibiotiques. Généralement, *Escherichia coli* est utilisé en tant qu'indicateur chez les bactéries à Gram-négatif tandis que les entérocoques le sont pour celles à Gram-positif [400]. Dans le cas présent, on ne parle pas de la prévalence de la résistance chez les bactéries pathogènes, ni au niveau de la flore microbienne de la viande au détail. La procédure utilisée afin d'évaluer cette résistance consiste à : 1) la collecte de fèces, ou si à l'abattoir, directement de l'intestin des animaux, 2) l'enrichissement, l'isolement et l'identification bactériennes, 3) la détermination de la susceptibilité aux antibiotiques et parfois, 4) la détermination des gènes de résistance aux antibiotiques impliqués [383].

Au cours de notre étude, toutes ces étapes ci-mentionnées ont été effectuées afin de combler le manque de données sur la résistance aux antibiotiques des entérocoques porcins et aviaires au Québec tant au niveau phénotypique que génotypique ainsi que sur la présence d'éléments génétiques mobiles. Au cours de ces analyses, nous pouvons constater les lacunes sur les d'informations acquises dans les divers programmes nationaux de surveillance de la résistance aux antibiotiques. Le problème de ce type d'analyse est entre autres l'étape d'enrichissement qui permet d'isoler et d'identifier les bactéries indicatrices. Cette étape fait en sorte que l'on amplifie une bactérie en particulier et également la ou les résistances qu'elle contient. De plus, la sélection de

bactéries fait en sorte que l'on peut sous-estimer certaines résistances. Ceci ne représente donc pas réellement la prévalence de la bactérie et/ou de la résistance qu'elle porte dans la communauté entière. Des clones peuvent être également sélectionnés et bien souvent, les gènes de résistance ne sont pas détectés. On connaît bien aujourd'hui l'importance des éléments génétiques mobiles dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques [29]. Il semble que cela démontre bien l'importance de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans ces résistances afin d'observer les probabilités de propagation de ces différents mécanismes. De plus, bien souvent, la possession d'un seul gène peut conférer la résistance à de multiples antibiotiques et/ou classes d'antibiotiques. Une étude récente [458] a démontré que, sous des conditions de culture limitées, les porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques appartenaient à plusieurs groupes de commensaux, principalement des bactéries à Gram-positif (*Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp.). Par contre, les porteurs identifiés variaient selon les gènes de résistance spécifiques, même dans un même hôte. *E. coli/Shigella* sp. ont été identifiés comme étant les principaux porteurs du gène *sul2* (sulfamides) chez un hôte. Ainsi, leurs données fournissent une justification scientifique pour la sélection de bactéries indicatrices appropriées, particulièrement parmi un large réservoir de bactéries commensales, afin de surveiller la résistance aux antibiotiques dans des écosystèmes microbiens ciblés. Malgré leurs limitations, les méthodes basées sur les milieux de culture se sont révélées inestimables dans la sélection des souches à caractériser phénotypiquement, dans l'évaluation de la dynamique des populations résistantes aux antibiotiques et dans les détails de leur dissémination.

Plusieurs études ont démontré une modification de la prévalence de certains genres bactériens lorsqu'un traitement aux antibiotiques était donné [405, 459]. En effet, lors de ces traitements, il semble que ce soit les bactéries indicatrices (p.e. *Enterococcus* spp.) résistantes aux antibiotiques qui prennent l'avantage sur le reste de la population, réduisant ainsi la diversité microbienne commensale [405]. Ceci démontre bien l'importance des gènes de résistance acquis lors de ces moments de sélection. L'utilisation non-thérapeutique des antibiotiques chez les animaux de consommation semble augmenter le réservoir de gènes de résistance, ainsi que leur densité, puisque les

bactéries se disséminent en grand nombre dans l'environnement. Il peut être difficile de suivre un gène de résistance en particulier puisque ces gènes sont fréquemment introduits chez des bactéries de différentes espèces ou des souches qui ne ressemblent plus du tout à l'hôte original. Ce manque de barrière entre les espèces bactériennes dans la transmission des gènes démontre qu'il faudrait se concentrer davantage envers la recherche portant sur les mécanismes génétiques [460]. Il existe une base de données sur les réservoirs de résistance aux antibiotiques (ROAR; www.roarproject.org). C'est un organisme naissant qui promouvoit l'accumulation de données se concentrant spécifiquement sur les souches commensales et environnementales en tant que réservoir de gènes de résistance.

Grâce à l'avancement en technologies moléculaires, il est très intéressant de considérer l'analyse de la population commensale dans son contenu général en gènes de résistance aux antibiotiques. Ainsi, l'analyse métagénomique est un outil de plus en plus utilisé dans l'étude de la composition et de la diversité des microbiomes [461]. La structure et la fonction de la communauté microbienne intestinale a reçu une attention particulière pendant des décennies, mais la plupart des travaux étaient restreints à l'utilisation de techniques utilisant des milieux de culture. Les approches métagénomiques ont l'avantage de fournir des données plus complètes sur le potentiel fonctionnel présent dans les communautés microbiennes sans l'amplification d'une espèce bactérienne particulière. Une étude de Lamendella et al. [462] a démontré que 6% de toutes les lectures métagénomiques, provenant de fèces de porc, étaient impliquées dans des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Les lectures peuvent être analysées afin de déterminer la provenance phylogénétique des gènes [461] et ainsi démontrer une prévalence et une occurrence globale des gènes de résistance aux antibiotiques dans une flore commensale déterminée. Une étude sur le microbiome porcin a démontré, par ce type d'analyse, que peu importe le mécanisme de sélection, l'utilisation des antibiotiques a augmenté l'abondance des gènes de résistance, spécifiques ou non aux antibiotiques administrés, dans le microbiome. De plus, cette augmentation a pu être détectée malgré une grande diversité des gènes de résistance déjà présents [459]. Ainsi, les analyses métagénomiques fonctionnelles semblent être un outil

adéquat dans l'évaluation de la prévalence de la résistance aux antibiotiques dans des environnements à haute densité cellulaire.

4. Évaluation de l'antisérum Agg dans l'interférence du transfert des gènes de résistance aux antibiotiques

La résistance acquise aux antibiotiques est souvent associée à des éléments génétiques mobiles, dont particulièrement les plasmides qui sont capables d'être maintenus de façon stable dans plusieurs générations bactériennes consécutives et de se disséminer à travers une population bactérienne. Trois types de plasmides sont connus comme étant capable de se répliquer chez les entérocoques soient les plasmides RCR à large spectre (Rolling Circle Replicating), les plasmides *Inc18* et les plasmides répondant aux phéromones. Une des propriétés les plus étudiées des plasmides répondant aux phéromones est son mécanisme de conjugaison unique. Ce dernier est basé sur la sécrétion de molécules nommées phéromones et l'expression d'une adhésine nommée substance agrégative (SA ou protéine d'agrégation) [296]. Réduire le transfert conjugal de type répondant aux phéromones chez l'espèce *E. faecalis* pourrait être d'un grand intérêt de par son importance clinique dans le transfert horizontal de la résistance aux antibiotiques [36].

Dans notre étude, la détection du gène de la substance agrégative chez les isolats *E. faecalis* aviaires du profil phénotypique prédominant de la résistance aux antibiotiques a démontré sa présence chez 77.3 % des souches (Tableau III).

Tableau III. Pourcentage des isolats positifs pour *agg* dans le profil phénotypique prédominant des isolats *E. faecalis* aviaires.

Profil génotypique d'antibiorésistance	Nb. total d'isolats	% d'isolats positifs pour <i>agg</i> (nb. d'isolats)
<i>bcrR, bcrB, erm(B), tet(M)</i>	15	80 (12)
<i>erm(B), tet(M)</i>	11	45.5 (5)
<i>bcrB, erm(B), tet(M)</i>	4	100 (4)
<i>bcrR, bcrB, erm(B), vat(D), tet(M)</i>	3	100 (3)
<i>bcrB, erm(B), tet(O)</i>	2	100 (2)
<i>bcrR, bcrB, erm(B), tet(M), tet(O)</i>	2	100 (2)
<i>bcrR, bcrA, bcrB, erm(B), vat(D), tet(O)</i>	2	100 (2)
<i>erm(B), tet(O)</i>	1	100 (1)
<i>bcrB, erm(B)</i>	1	0 (0)
<i>erm(B), lin(B), tet(M)</i>	1	100 (1)
<i>bcrB, erm(B), lin(B), tet(M)</i>	1	100 (1)
<i>bcrR, bcrA, bcrB, erm(B), vat(D), tet(M)</i>	1	100 (1)
Total	44	77.3 (34)

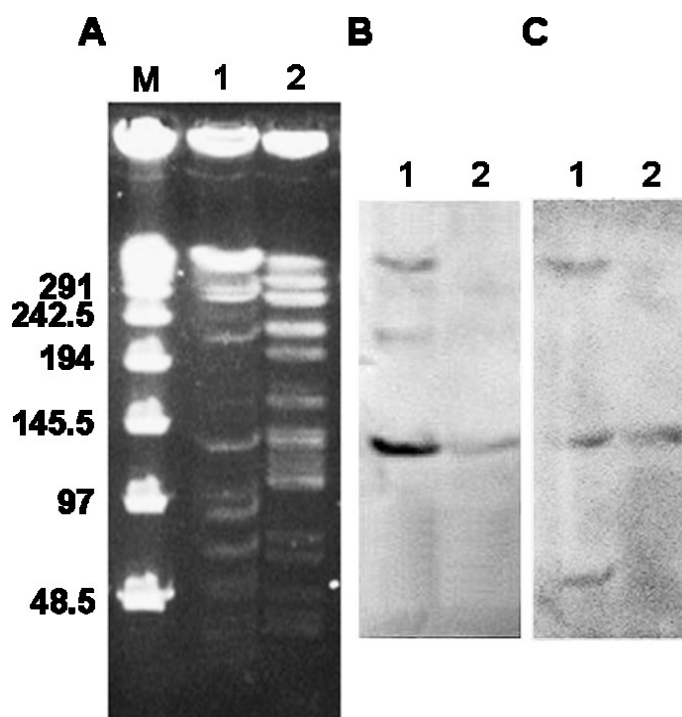
La souche aviaire *E. faecalis* 543 multirésistante a été analysée pour la présence d'un plasmide répondant aux phéromones et codant pour de la résistance à de fortes concentrations de bacitracine. Après induction avec les phéromones produites par la souche réceptrice *E. faecalis* JH2-2, la formation d'agrégats par la souche *E. faecalis* 543 a pu être observée. La réponse aux phéromones a également été confirmée par de haut taux de transfert durant une courte conjugaison en bouillon suite à l'induction de la SA. Puisque nous étions face à la présence d'un plasmide répondant aux phéromones non-décrit jusqu'à présent, nous devons démontrer préalablement la capacité d'interférer dans le transfert horizontal de ce plasmide et également, d'interférer dans la formation d'agrégats y étant rattachée par l'utilisation d'un antisérum polyclonal SA. Ainsi, un antisérum polyclonal SA₄₄₋₅₆₀ a effectivement permis de démontrer une réduction significative du transfert plasmidique et du nombre d'agrégats par champs microscopique observé.

Les résultats de PCR ont confirmé les résultats de biopuce, obtenus suite à la conjugaison sur filtre, du co-transfert des gènes *asaI* et de résistance à la bacitracine, *bcr*. La colocalisation des gènes *traB*, *asaI* et *bcrA* a été observée, par PFGE et hybridation, sur un même plasmide d'environ 115 kb chez la souche donatrice *E.*

faecalis 543 et dans le transconjuguant T543-1. Des analyses dans le programme BLAST des gènes *asaI*, *traB* et *bcr* de T543-1 ont permis d'associer cet élément mobile au plasmide répondant aux phéromones pJM01. Ensuite, le gène *bcrD*, faisant partie normalement de l'opéron *bcrRABD*, n'avait pas été détecté par PCR chez la souche *E. faecalis* 543. Les amorces utilisées pour la détection du gène *bcrD* lors d'une étude précédente [438], ont amplifié adéquatement le produit PCR dans le contrôle positif des gènes *bcr* soit *E. faecalis* AR01/DGVS [392]. C'est grâce au séquençage de la région au-delà de *bcrB* et son analyse dans BLAST qui ont permis de déterminer une identité de 82% avec le gène *bcrD* des plasmides répondant aux phéromones pJM01 et pTW9. L'absence d'amplification avec les amorces de l'étude précédente est probablement due au faible degré de similarité observé. Il se peut donc qu'il y ait eu une certaine sous-estimation de la présence du gène *bcrD* dans les souches étudiées.

Une souche *E. faecalis* 52, qui a été caractérisée dans une de nos études précédentes [438], possédant les gènes *asaI* et *bcrRAB*, a également été analysée par PFGE et par hybridation (Figure 3). La souche *E. faecalis* 52 a également démontré un co-transfert des gènes *asaI* et *bcrA* par PCR suite à une conjugaison sur filtre. Les analyses ont également révélé une colocalisation des gènes sur un plasmide d'environ 134 kb chez le donneur et le transconjuguant T52-1, et de multiples copies du gène *bcrA* dans la souche donatrice *E. faecalis* 52. Ces observations, en plus de l'analyse des séquences au-delà du gène *bcrR* correspondant à un gène de transposase de la séquence d'insertion IS1216-like, semble nous indiquer que les gènes *bcr* se retrouvent sur un transposon. Ainsi, la dissémination d'un transposon codant pour de la résistance élevée envers la bacitracine pourrait se produire dans les isolats *E. faecalis* par différents mécanismes de transfert horizontal des gènes tels que la conjugaison répondant aux phéromones.

Figure 3. PFGE et Hybridation sur la souche *E. faecalis* 52 et le transconjuguant T52-1. PFGE (A) et hybridation avec sondes marquées à la digoxigénine (B) *asaI* et (C) *bcrA*. Puits chargés avec : (1) Souche *E. faecalis* 52; (2) transconjuguant; (M) Marqueur de poids moléculaires (en kb).



Il a été décrit que les plasmides répondant aux phéromones pouvaient facilement jouer un rôle dans la distribution des transposons et dans la mobilisation d'autres éléments étant capables de se répliquer dans un microorganisme receveur [298, 463]. Le plasmide d'environ 115 kb de la souche *E. faecalis* 543 a pu être transféré dans une souche porcine de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), mais cet élément génétique mobile codant pour de la résistance élevée envers la bacitracine n'a pu être maintenu dans la souche SARM en question. Il est décrit que malgré l'absence de capacité de répllication des plasmides répondant aux phéromones dans d'autres genres bactériens, le transfert pouvait tout de même se produire [297]. Dans ce type de transfert, la bactérie receveuse ne serait généralement pas productrice de phéromones et ainsi donc le système de transfert ne serait pas opérationnel. Malgré tout, dans le cas du plasmide pAD1, l'existence d'un phénomène de variation de phase a été décrit et ce dernier permettrait d'activer spontanément les fonctions de conjugaison amenant ainsi un

transfert sans la présence de phéromones [297]. À une fréquence de 10^{-3} à 10^{-4} , des colonies sur géloses apparaissent avec un phénotype dit Dry⁺ (expression de la protéine d'agrégation) sans la présence de phéromones. Les bactéries de ces colonies sont dites Dry^c, car elles expriment les fonctions de conjugaison de façon constitutive et permettent le transfert des plasmides à haute fréquence en bouillon sans la nécessité d'induction de la protéine d'agrégation par des phéromones [464]. Ce phénomène serait relié à l'apparition spontanée de changements structuraux de l'ADN, soit l'augmentation du nombre d'itérons, apparaissant entre les gènes *repA* et *repB* du plasmide [465]

Avant de procéder à l'interférence du transfert horizontal de la conjugaison répondant aux phéromones ainsi que dans la formation d'agrégats de notre plasmide, la spécificité de l'antisérum polyclonal Agg₄₄₋₅₆₀ a été testée par immunobuvardage en utilisant les extraits de protéines (extraction au lysozyme) provenant des souches *E. faecalis* 543 induites et non-induites, et de la souche *E. faecalis* JH2-2 utilisée en tant que contrôle négatif. L'hybridation a été observée sur une protéine d'environ 180 kDa et sur la protéine purifiée Agg₄₄₋₅₆₀. Il est mentionné que différents états de repliement de la protéine mature, allant de 137 à 190 kDa, pouvaient être observés par immunobuvardage selon les différentes méthodes d'extraction, les températures de dénaturation et les conditions de migration [162]. De plus, le domaine N-terminal inclut la région la plus variable de la protéine [466]. Puisqu'aucun domaine N-terminal de la protéine à 78 kDa n'a été observé, une réaction croisée limitée de ce fragment avec l'antisérum Agg₄₄₋₅₆₀ pourrait en être l'explication. Il est également mentionné que l'extraction au lysozyme résulte en un taux beaucoup plus élevé de la protéine d'agrégation mature comparativement à un protocole d'extraction par détergent où la portion N-terminale de 78 kDa est principalement isolée [162]. Le fait que l'antisérum utilisé dans cette étude a détecté seulement une protéine, extraite de la souche induite, et pas de celle non-induite, indique que la réponse immunologique observée était spécifique.

Une réduction significative de l'agrégation a été observée après l'ajout de l'antisérum polyclonal Agg₄₄₋₅₆₀. De plus, une réduction significative du transfert plasmidique a été observée lorsque l'antisérum était utilisé au cours de la conjugaison et

ce, tel qu'observé dans une étude précédente [36]. La dilution utilisée de l'antisérum au cours de ces essais était de 1/10 versus 1/1000 lors de la détermination de la spécificité par immunobavardage. Il faut dire que des essais préliminaires ont été effectués au cours du projet en utilisant des dilutions de 1/1000, 1/500, 1/100, et pour finir à 1/10 où il y avait effectivement une diminution significative du taux de transfert observé. Il serait donc intéressant d'effectuer un essai d'immunobavardage en utilisant une dilution 1/10 de l'antisérum Agg (anticorps primaires) afin de vérifier si d'autres interactions avec les protéines extraites sont observées.

L'ajout de l'antisérum Agg n'a pas bloqué complètement le transfert conjugatif répondant aux phéromones. Ce résultat est similaire à ce qui a été décrit par Olmsted et al. [36]. Ce blocage incomplet pourrait peut-être s'expliquer par le fait que les anticorps utilisés dans cette étude sont dirigés seulement contre la partie N-terminale de la protéine allant des acides aminés 44 à 560. La protéine possède deux domaines d'agrégation, soit des acides aminés 156 à 358 et de 473 à 683. Les deux domaines seraient importants dans le processus d'agrégation et dans la liaison au récepteur à la surface de la bactérie receveuse, ce dernier étant composé en partie de l'acide lipotéichoïque [160]. En fait, il est décrit que le domaine allant des acides aminés 473 à 683 pourrait avoir un rôle distinct dans l'agrégation bactérienne autre que la liaison à l'ALT, et qu'ainsi il pourrait être responsable d'une agrégation spécifique à l'espèce. Dans notre étude, il se pourrait que le second domaine soit tout de même en partie exposé et engendrerait une agrégation des bactéries et donc un possible transfert conjugatif. De plus, Waters et al. [37] ont décrit que l'hydrophobicité de la surface cellulaire pourrait être nécessaire mais non suffisante pour former des agrégats. Plusieurs facteurs semblent être impliqués dans le processus d'agrégation et amènent donc plusieurs variables dans l'interférence de la conjugaison répondant aux phéromones.

Les entérocoques servent en tant que réservoir dans la propagation de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes [296, 463]. Il est intéressant et préoccupant de voir une grande occurrence des plasmides répondant aux phéromones

dans les souches commensales de cette étude. En effet, le gène codant pour la protéine d'agrégation a été détecté chez 77.3% des souches *E. faecalis* et 52.6% des souches *E. faecium* aviaires des deux profils prédominants. Dans les souches *E. faecalis* porcines des deux profils, 66.7% et 88.9% furent positives, respectivement. Il a été décrit que la production de phéromones cAD1 était significativement influencée par la présence d'oxygène [467]. Lorsque des souches *E. faecalis* réceptrices étaient incubées en absence d'oxygène, 16 fois plus de phéromones cAD1 étaient produites comparativement en présence d'oxygène. Cette observation pourrait donc impliquer que l'agrégation et le transfert conjugatif peuvent être assez élevés dans l'environnement intestinal. Puisque nous avons démontré un blocage significatif de l'agrégation et du transfert conjugatif répondant aux phéromones chez un isolat aviaire, la prochaine étape consisterait à poursuivre cette expérimentation *in vivo*. Une étude de Licht et al. [468] a démontré que la majorité des transferts conjugatifs prenaient place dans la couche muqueuse recouvrant les cellules épithéliales de l'intestin. La même équipe a testé les niveaux de transfert conjugatif répondant aux phéromones du plasmide pCF10 *ex vivo* en utilisant le mucus de cecum de rats [303]. De plus, même si les phéromones sont hydrophobes et susceptibles aux protéases, il a été démontré que ces derniers avaient un effet positif sur le transfert plasmidique dans le mucus intestinal [303]. Le transfert *in vivo* du plasmide pCF10 dans le tractus gastrointestinal de mini-cochons traités à la streptomycine a également été démontré [304]. Les receveurs et les transconjugants ont été observés jusqu'à 60 et 35 jours, respectivement, après leur introduction. L'efficacité du transfert génétique par conjugaison répondant aux phéromones a été illustrée par la quantité de transconjugants détectés dans les fèces [304]. C'est-à-dire qu'elle était similaire à celle observée pour le transfert de l'élément R1drd19, codant pour un pilus flexible, entre des *E. coli* du porc, même si les niveaux initiaux des bactéries *E. faecalis* donneuses et receveuses étaient un à deux logs plus bas que ceux rapportés pour *E. coli*. Ces études donnent donc une piste à suivre dans l'interférence de la conjugaison répondant aux phéromones *ex vivo* et *in vivo*.

En conclusion, les plasmides répondant aux phéromones représentent un composite de déterminants génétiques hautement évolué capable d'agir en concert afin

de contribuer, non seulement à la pathogénie chez l'homme et à la résistance aux antibiotiques, mais également d'assurer la survie et la dissémination des entérocoques dans divers écosystèmes incluant une variété d'animaux, dans le sol et l'eau, et dans les végétaux.

5. Association entre la virulence et la résistance aux antimicrobiens chez des souches cliniques humaines et canines

En médecine vétérinaire, jusqu'à récemment, le genre *Enterococcus* était considéré comme étant des bactéries résidentes du tractus gastrointestinal causant rarement des infections opportunistes et ayant une faible capacité à causer des dommages [6, 24]. Plusieurs évidences ont démontré que les entérocoques possèdent des facteurs de virulence et de multiples résistances aux antibiotiques leur permettant ainsi de survivre dans les environnements hospitaliers, de les aider au développement de la maladie, et de résulter en des infections étant difficiles à traiter [6]. Dans cette partie du projet, des souches *E. faecium* cliniques d'origine humaine et canine ont été analysées.

Il a été décrit que des souches *E. faecium* avaient une spécificité d'hôte, une tendance à se regrouper en fonction de l'espèce d'origine et étaient généralement non reliées aux lignées humaines d'importance clinique [78, 469]. Cependant, des données récentes semblent démontrer des liens entre les isolats *E. faecium* résistants à l'ampicilline (EFRA) d'origine canine et humaine. En Europe, les chiens en bonne santé ont récemment été identifiés comme étant des porteurs fréquents de souches humaines EFRA CC17 associées aux hôpitaux, et autres lignées reliées [470, 471]. Aux États-Unis, des résultats similaires ont été observés dans des fèces de chiens ayant séjourné dans une unité de soins intensifs (USI) d'un hôpital d'enseignement en médecine vétérinaire [405]. Les premiers isolats cliniques EFRA CC17 canins ont récemment été isolés d'infections du tractus urinaire (ITU) dans des hôpitaux d'enseignement vétérinaire ainsi que des hôpitaux vétérinaires régionaux à Séoul, en République de Corée [472]. De plus, un cas difficile d'ITU canine associée à EFRA et à *Escherichia coli* a récemment été signalé à un laboratoire de diagnostic de la Faculté des Sciences de la Vie de l'Université de Copenhague au Danemark [470]. Il a été suggéré que la

lignée CC17 est plus apte à infecter les chiens, ainsi que les humains, que toutes autres lignées [472]. Il a également été démontré, par électrophorèse à champs pulsé, que les profils de certains isolats canins et humains avaient au-delà de 90% de similarité [472].

À notre connaissance, cette étude décrit pour la première fois la caractérisation d'isolats cliniques EFRA canins associés à CC17 (ST17) au Canada. Ces isolats proviennent d'ITU, de plaie et de cholangiohépatite. Ils appartenaient majoritairement à des lignées liées à ST17 et encore plus intéressant, à deux nouvelles lignées également reliées à ST17. Il est intéressant d'observer que tous les isolats EFRA canins étaient résistants à la ciprofloxacine et à la lincomycine. De la résistance élevée envers la gentamicine, la kanamycine et la streptomycine, et également envers les macrolides étaient communes. La fréquence de la résistance envers la tétracycline était aussi élevée tandis que celle envers la vancomycine n'a pas été détectée chez ces isolats. La vancomycine et la gentamicine sont deux antibiotiques de première ligne pour le traitement des infections potentiellement mortelles à entérocoques chez l'humain, soit utilisés séparément ou en combinaison avec les bêta-lactamines [22].

Dans notre étude, tous les isolats EFRA associés à CC17 avec de la résistance élevée envers la ciprofloxacine (CMI > 16 µg/ml) ont démontré des substitutions dans les séquences en acides aminés de la topoisomérase IV et de l'ADN gyrase. Une étude a démontré une corrélation entre la résistance à l'ampicilline et à la ciprofloxacine chez des isolats très similaires génétiquement portant tous l'allèle *purK-1*, marqueur du CC17 [473]. Cette corrélation est effectivement compatible avec nos résultats. De plus, des CMIs plus élevées ont occasionnellement été observées chez des mutants ayant acquis des substitutions tant dans le gène *gyrA* que *parC* [474]. Plusieurs études n'ont pas observé de mutations dans le gène *gyrB* des entérocoques [475-477], mais deux isolats de notre étude ont présenté trois substitutions en acides aminés dans GyrB. La contribution de ces changements dans GyrB à la résistance à la ciprofloxacine est difficile à évaluer puisque les substitutions observées dans GyrA et ParC sont suffisantes pour conférer une résistance élevée à la ciprofloxacine de nos isolats.

Plusieurs autres mécanismes de résistance peuvent être responsables de la résistance à de plus faibles concentrations de ciprofloxacine chez nos isolats associés à CC17 et qui ne contiennent pas de substitutions d'acides aminés dans parC et GyrA. La résistance, par expulsion active des quinolones ou par une augmentation de l'expression de pompes à efflux endogènes, sont des mécanismes alternatifs de résistance aux quinolones rapportés chez *E. faecalis* [478, 479]. Récemment, la caractérisation d'une pompe à efflux (EfmA) envers de multiples antibiotiques (quinolones et macrolides), a été décrite chez *E. faecium* [480]. Ainsi, ce mécanisme de résistance pourrait expliquer la résistance à de plus faibles concentrations de ciprofloxacine chez certains de nos isolats associés à CC17.

La plupart des isolats EFRA CC17 d'origine humaine ont démontré la présence de gènes de virulence codant pour une protéine de surface des entérocoques (*esp*), une hyaluronidase (*hyl*) et une protéine de liaison au collagène (*acm*), lesquels sont considérés comme étant des marqueurs pour CC17 [12, 477]. Les isolats EFRA canins contiennent généralement beaucoup de facteurs de virulence [471]. Dans une étude récente, tous les isolats canins ont démontré la présence du gène *acm*, jouant un rôle important dans la colonisation, mais rarement des gènes *esp* et *hyl* [472]. De façon similaire, dans cette étude, les gènes *esp* et *hyl* n'ont pas été observés chez nos isolats EFRA canins tandis qu'ils étaient tous positifs pour la détection du gène *acm*. La plupart de ces isolats ont démontré la présence du gène *efaA_{fm}*, lequel code pour une adhésine liée à la membrane cellulaire et est homologue au gène de virulence associé aux endocardites *efaA* d'*E. faecalis* [183, 481]. Le gène *efaA_{fm}* a été détecté chez quatre isolats d'origine humaine et le gène *acm* était également présent chez tous ces isolats. Contrairement aux isolats *E. faecium* canins, deux isolats d'origine humaine possédaient le gène *hyl* en combinaison avec le gène *esp*, tel que précédemment décrit pour les isolats EFRA CC17 d'origine humaine [477].

Les isolats EFRA canins de cette étude n'ont démontré aucune activité gélatinase, cytolytique ou de formation de biofilm. Cette observation est compatible avec un rapport récent où aucun des isolats *E. faecium* canins testés ne démontraient ces activités ni la présence du gène *esp* [405]. Dans notre étude, les facteurs de virulence des

isolats canins, en comparaison à ceux présents chez les isolats humains, étaient similaires à deux occasions avec *efaA_{fm}* et *acm* comme étant les seuls gènes de virulence identifiés. Cependant, ces isolats ont été regroupés différemment, tant par PFGE que par MLST. Une étude précédente a suggéré que les EFRA canins pourraient représenter les premiers ancêtres dans l'évolution des souches pathogènes humaines [471]. Davantage d'études sont nécessaires afin d'évaluer la virulence des souches canines en comparaison avec celles d'origine humaine et, plus globalement, dans le but de quantifier l'ampleur de cet éventuel problème zoonotique.

La technique du MLST procure un système de typage précis et hautement discriminatoire qui peut être utilisée pour la plupart des bactéries et autres organismes. Cette approche peut être particulièrement intéressante dans le typage des bactéries pathogènes. Dans notre étude, en plus des génogroupes reliés à ST17, nous avons également constaté la présence d'autres groupes ST chez *E. faecium*, soient ST65 et ST1. Si l'on se réfère à la base de données du site <http://www.mlst.net/databases/>, ces groupes ST ne sont pas répertoriés en Amérique du Nord. En fait, peu d'études font références aux génogroupes ST au Canada. Il serait donc intéressant d'amasser une plus grande banque de souches afin de les comparer à la base de données du site et de déterminer ainsi une possible origine des différents groupes ST à travers le pays. L'échantillonnage devrait être effectué afin de pouvoir observer un lien épidémiologique entre les souches soient au niveau de la région, de l'hôte, de la date et de l'origine d'isolement (souche commensale, environnementale, alimentaire ou clinique).

Dans cette étude, *E. faecium* était significativement associé à la présence de multiples gènes de résistance aux antibiotiques, tandis que les gènes de virulence étaient moins nombreux. Cette observation est en accord avec des études précédentes où *E. faecium* est généralement plus résistants aux antibiotiques qu'*E. faecalis* dont ce dernier est fréquemment porteur de nombreux gènes de virulence [482, 483]. Il a été suggéré que cela reflétait la plus grande prévalence des *E. faecalis* dans les infections nosocomiales à entérocoques [81]. Les familles de plasmides *rep₆* et *rep₁₁* ont significativement été associées aux isolats d'origine canine. La famille de plasmide *rep₆* est connue comme étant de petits plasmides cryptiques. La détection des familles *rep* est

un outil utile pour ce genre de plasmides puisqu'ils ne possèdent aucun phénotype détectable. Des études récentes ont démontré, par le typage des réplicons, une prévalence élevée d'un de ces plasmides cryptiques (pRI1), chez les entérocoques d'origine animale et humaine, indiquant la possibilité d'une grande dissémination de ce type de plasmide [484]. Le gène codant pour la substance agrégative a été détecté chez un isolat *E. faecium* d'origine canine. Jusqu'à maintenant, trois plasmides répondant aux phéromones ont été décrit chez *E. faecium*; pHKK100 (55 kb) qui a été le premier plasmide décrit codant tant pour la résistance à la vancomycine que pour la réponse aux phéromones [423], pHKK701 (92 kb) lequel est une fusion du transposon composite Tn5506 avec le plasmide pHKK703 portant de la résistance à la vancomycine [424], et pBRG1 (50 kb) lequel porte également le gène de résistance à la vancomycine, *vanA* [425]. Ces plasmides n'ont pas pu être détectés par la procédure utilisant les séquences *rep*; cependant les gènes de résistance aux antibiotiques correspondant qui ont été détectés dans la souche *E. faecium* ne suggèrent pas la présence de ces plasmides. Un îlot de pathogénie codant pour une substance agrégative a été décrit chez *E. faecalis* [173], ceci pourrait également être le cas pour cet isolat *E. faecium* clinique.

Une corrélation significative entre l'absence de loci CRISPR-*cas* et la présence de gènes de résistance aux antibiotiques a déjà été décrite pour *E. faecalis* [420]. Aucune corrélation inverse de ce genre n'a été retrouvée dans cette étude puisqu'aucun élément CRISPR n'a été détecté chez les isolats *E. faecium*. Peu d'étude ont observé la présence de ces éléments chez l'espèce *E. faecium*, car peu de souches ont également été analysées [420].

Considérant les résultats de biopuce obtenus, la présence d'éléments mobiles et l'analyse statistique ayant été faite, il est également intéressant de noter que les souches cliniques humaines étaient significativement associées aux gènes *erm*(B), *erm*(AM), *aadE*, *sat*(4), *aph*(3')-IIIa et IS1182 lesquels étaient également associés à la famille de plasmide *rep*₁₇. Cette famille inclue le plasmide pRUM (24.8 kb), lequel code pour ces mécanismes de résistance aux antibiotiques, et a été identifié la première fois dans un isolat clinique *E. faecium* [340]. Les souches *E. faecium* humaine 18707 et 18231

n'étaient pas clonale selon nos analyses mais semblaient l'être parfaitement selon leur contenu génotypique. Une explication pourrait impliquer la présence d'un élément mobile tel que le transposon *Tn5405* (12 kb) sur lequel on peut retrouver le groupe de gènes *IS1182*, *aph(3')-IIIa*, *aadE* et *sat(4)*. Par contre, cet élément est habituellement retrouvé chez l'espèce *Staphylococcus aureus* [485]. Les souches *E. faecium* 16717 et 18581 pourraient bien avoir le plasmide de multirésistances pUW786 lequel code pour les gènes *vanA*, *erm(B)*, *aadE*, *sat(4)*, *aph(3')-IIIa*, *IS1182* et *IS150-like* démontrant de la résistance envers la vancomycine, les MLS_b, la streptomycine, la streptothricine et la kanamycine, respectivement (GenBank No. AF516335).

En conclusion, cette étude avait une limitation au niveau de la provenance et du nombre d'isolats testés, et donc certaines corrélations n'ont probablement pas pu être observées. Cependant, cette étude fournit la première caractérisation d'isolats cliniques EFRA canins associés à CC17 (ST17) au Canada. Nos résultats indiquent que les isolats EFRA canins peuvent contenir de la multirésistance aux antibiotiques (2 à 9) dont celles envers la ciprofloxacine, la lincomycine et la tétracycline étant la combinaison la plus commune avec ou sans les résistances à fortes doses envers la gentamicine, la kanamycine et la streptomycine. Ces données supportent également l'importance d'une utilisation prudente des antibiotiques en médecine vétérinaire afin d'éviter la dissémination zoonotiques des isolats EFRA canins. D'autres études sont nécessaires afin de mieux comprendre l'importance de l'espèce canine dans la propagation de cet agent pathogène nosocomial à travers la communauté. L'occurrence des EFRA chez les chiens et autres animaux domestiques devraient être abordée par les programmes de surveillance nationaux afin d'explorer l'importance du réservoir animal dans l'évolution des entérocoques d'origine humaine associés aux hôpitaux.

V. CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

Conclusions générales

Les résultats de cette étude ont démontré que :

- ⇒ Tous les isolats *E. faecalis* et *E. faecium* aviaires et porcins des abattoirs du Québec étaient résistants à au moins une classe d'antibiotique.
- ⇒ Un profil phénotypique donné de résistance aux antibiotiques peut être associé à différentes combinaisons de gènes de résistance aux antimicrobiens tant chez les isolats *E. faecalis* et *E. faecium* de la volaille que ceux du porc.
- ⇒ Les entérocoques commensaux aviaires et porcins des abattoirs du Québec ne semblent pas représenter un réservoir de résistance à la vancomycine.
- ⇒ Les entérocoques commensaux aviaires et porcins des abattoirs du Québec peuvent représenter un réservoir de gènes de résistance envers les aminoglycosides (fortes doses), la quinupristine/dalfopristine, la bacitracine, la tétracycline et les macrolides.
- ⇒ L'utilisation des antibiotiques des classes MLS_B et des tétracyclines pourraient maintenir la résistance envers ces deux classes d'antibiotiques chez la volaille et le porc via le processus de cosélection. Cette cosélection a été démontrée par la colocalisation des gènes de résistance *erm*(B)/*tet*(O) et *erm*(B)/*tet*(M) sur un plasmide de faible poids moléculaire d'environ 11 kb et 9 kb, respectivement, chez des isolats *E. faecalis* aviaires et porcins. Des expérimentations de conjugaison suggèrent que ces résistances aux antibiotiques pourraient être transférées vers d'autres bactéries via ce même plasmide.
- ⇒ Les gènes de résistance à la bacitracine, *bcrAB* et *bcrR*, semblent se retrouver sur un transposon. Le gène *bcrA* a été co-localisé avec le gène *asaI* et le gène de régulation négative de la réponse aux phéromones, *traB*, sur un plasmide d'environ 115 kb chez un isolat *E. faecalis* aviaire. Les tests d'agrégation ainsi que de conjugaison ont confirmé la présence d'un plasmide répondant aux

phéromones. Les gènes *bcrA* et *asaI* ont également été retrouvés séparément et co-localisés sur des plasmides de différents poids moléculaires dans une autre souche *E. faecalis* aviaire.

- ⇒ Le séquençage des régions au-delà des gènes *bcrR* et *bcrB* a révélé la présence d'un gène similaire à une transposase de la séquence d'insertion *IS1216* et la présence du gène *bcrD* avec une similarité moindre à celui déjà séquencé des plasmides pJM01 et pTW9.
- ⇒ L'utilisation d'un antisérum polyclonal Agg₄₄₋₅₆₀ a démontré une diminution significative dans le transfert plasmidique des gènes *asaI* et *bcrR*, *bcrAB* de la souche donneuse *E. faecalis* 543 vers la souche receveuse *E. faecalis* JH2-2, et cette réduction a également été observée dans le nombre d'agrégats par champs microscopiques.
- ⇒ L'analyse de souches cliniques *E. faecium* d'origine humaine et canine du Québec, Canada a permis de caractériser pour la première fois des isolats EFRA canins associés au CC17 (génogroupe ST17). Elle a permis également de confirmer que l'espèce *E. faecium* était associée à de multiples résistances aux antibiotiques contrairement à un faible nombre de gènes de virulence. Un grand nombre de familles de plasmides a été détectée et ce, peu importe l'hôte. Les familles de plasmides *rep₆* et *rep₁₁* ont significativement été associées aux isolats d'origine canine. La résistance à la vancomycine n'a été détectée que chez les isolats d'origine humaine.

En conclusion, il est important de maintenir la surveillance de la résistance aux antibiotiques tant au niveau phénotypique que génotypique, car même si l'on arrêta d'utiliser les antibiotiques, il n'est plus vraisemblable de croire que les souches sensibles remplaceront obligatoirement les populations bactériennes résistantes. Ce phénomène est causé par un coût d'énergie plus faible dû à l'évolution et à l'adaptation fulgurante de ces bactéries. Avec le temps, il est clair que les souches résistantes sont maintenues malgré l'absence de pression sélective, en moins grand nombre, mais dès qu'il y aura

une ré-introduction d'antibiotiques, cette faible population bactérienne résistante prendra le dessus et remplacera la population sensible. De plus, cette pression sélective n'est pas seulement causée par les antibiotiques, mais également par d'autres composés tels que le cuivre, le zinc, les détergents avec ammoniums quaternaires, etc. La pression sélective peut être très large. Il est bien décrit que les éléments génétiques mobiles possèdent fréquemment des gènes de résistance à ces différents composés [486-488].

Perspectives directes et générales

Les perspectives à court et à long terme pour ce projet de recherche incluent :

- ⇒ Isoler et séquencer les plasmides de faible poids moléculaire d'environ 9 kb et 11 kb chez les isolats *E. faecalis* du porc et de la volaille afin de déterminer leur origine et leur étendue d'hôte.
- ⇒ Caractériser les gènes de virulence présents chez les isolats d'entérocoques commensaux aviaires et porcins des profils prédominants de multirésistance. Déterminer les associations entre ces gènes et les gènes de résistance aux antibiotiques afin d'observer l'ampleur de ces éléments chez les entérocoques et de fournir les informations sur le réservoir animal de ces gènes.
- ⇒ Caractériser les plasmides présents dans les profils prédominants de multirésistance et ceux présentant un plus grand nombre de résistance des isolats aviaires et porcins, par l'amplification des séquences Rep. Tout cela dans le but d'observer l'étendue des familles de plasmides retrouvées chez ces isolats commensaux du Québec et le réservoir potentiel d'éléments génétiques transférables vers d'autres agents potentiellement pathogènes.
- ⇒ Caractériser la présence de séquences CRISPR chez les isolats afin de corréler la présence de ces séquences chez les bactéries ayant un plus faible nombre de résistance aux antibiotiques. Une étude récente a démontré une corrélation entre la présence de séquences CRISPR chez des isolats *E. faecalis* et l'absence de gènes de virulence tels que l'opéron cytolysine et la substance agrégative associée aux plasmides répondant aux phéromones [489]. Il serait donc intéressant d'évaluer le potentiel de ces souches en tant que probiotique dans l'alimentation des animaux de consommation afin de graduellement réduire et remplacer le réservoir potentiel de gènes de résistance aux antibiotiques et/ou de virulence que peuvent représenter les entérocoques commensaux.

- ⇒ Isoler et séquencer le plasmide d'environ 115 kb de la souche *E. faecalis* 543 afin de déterminer des similitudes aux autres plasmides répondant aux phéromones. Tout cela dans le but d'apporter davantage d'informations sur le réservoir de ces plasmides répondant aux phéromones des isolats *E. faecalis* aviaires du Québec, car ils apportent une capacité de transfert hautement efficace.
- ⇒ Tester l'utilisation de l'antisérum Agg₄₄₋₅₆₀ lors d'un transfert répondant aux phéromones *ex vivo* grâce à des extraits de mucus de cecum de rats (sans germes) dans le but d'observer si la cinétique d'interférence du blocage sera la même qu'*in vitro*. Licht et al. [303] ont déterminé le rôle des phéromones *E. faecalis* lors du transfert du plasmide répondant aux phéromones pCF10 dans l'environnement intestinal en utilisant du mucus de cecum de rats sans germes. Ainsi, la même procédure pourrait être utilisée afin d'observer une interférence lors de l'ajout d'antisérum Agg₄₄₋₅₆₀. Le mucus de cecum de rats sans germes serait utilisé afin de s'assurer de l'absence d'une réponse immunitaire dirigée contre les antigènes de surface des entérocoques. Tout ceci dans le but de ne pas interférer avec notre antisérum testé.
- ⇒ Tester une immunisation passive avec l'antisérum Agg₄₄₋₅₆₀ dans le blocage du transfert répondant aux phéromones *in vivo* de mini-cochons traités aux antibiotiques. Cette expérimentation pourrait être une étape préalable à ce qui pourrait être observée en production animale lors de traitements aux antibiotiques afin de réduire le transfert de la résistance. L'interférence dans le transfert horizontal de la résistance aux antibiotiques portée par des plasmides répondant aux phéromones pourrait être déterminée tel que décrit par Licht et al. [304]. Les souches utilisées auraient des marqueurs de résistance spécifiques pour leur isolement et également au niveau du plasmide répondant aux phéromones. Les mini-cochons seraient préalablement traités à un des antibiotiques dont la résistance est utilisée comme marqueur de sélection afin d'éliminer le plus possible la flore commensale présente. Une souche *E. faecalis* réceptrice produisant des phéromones serait tout d'abord inoculée afin de coloniser le tractus gastrointestinal et plus tard, la souche donatrice serait ajoutée.

Suite à l'ajout de la souche donatrice, il faudra déterminer le moment propice à l'immunisation passive afin de s'assurer que la substance agrégative soit bien exprimée. L'étape qui serait effectuée préalablement avec le mucus de cecum de rats nous permettrait de déterminer approximativement à quel moment la substance agrégative est exprimée à la surface bactérienne. Afin d'effectuer le passage dans l'estomac, l'antisérum Agg serait encapsulé (protection pH et enzymes, libération rapide) et l'animal recevrait une dose de CaCO_3 afin de réduire le pH de l'estomac. La fraction F'ab des anticorps polyclonaux anti-Agg serait également utilisée afin d'éviter la réaction croisée de la portion Fc avec les antigènes.

- ⇒ Amasser une plus grande collection de souches cliniques humaines et animales afin d'effectuer une analyse comparative plus approfondie. Les souches collectées devront avoir des éléments permettant d'extrapoler un lien potentiel tels que la région, l'hôte, la date et l'origine d'isolement (souche commensale, environnementale, alimentaire ou clinique). Caractériser ces souches par MLST afin de déterminer leur origine et la diversification des génogroupes retrouvés au Canada. De plus, les programmes de surveillance nationaux devraient inclure la détection des EFRA isolés d'animaux domestiques afin d'explorer l'importance du réservoir animal dans l'évolution des entérocoques d'origine humaine associés aux hôpitaux.

VI. SOURCES DOCUMENTAIRES

1. Kuhn, I., et al., *Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(9): p. 5383-90.
2. Helie, P. and R. Higgins, *Diarrhea associated with Enterococcus faecium in an adult cat*. J Vet Diagn Invest, 1999. **11**(5): p. 457-8.
3. Manson, J.M., et al., *Characterization of a vancomycin-resistant Enterococcus faecalis (VREF) isolate from a dog with mastitis: further evidence of a clonal lineage of VREF in New Zealand*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(7): p. 3331-3.
4. Marsh-Ng, M.L., D.P. Burney, and J. Garcia, *Surveillance of infections associated with intravenous catheters in dogs and cats in an intensive care unit*. J Am Anim Hosp Assoc, 2007. **43**(1): p. 13-20.
5. Pressel, M.A., et al., *Vancomycin for multi-drug resistant Enterococcus faecium cholangiohepatitis in a cat*. J Feline Med Surg, 2005. **7**(5): p. 317-21.
6. Sava, I.G., E. Heikens, and J. Huebner, *Pathogenesis and immunity in enterococcal infections*. Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(6): p. 533-40.
7. Giridhara Upadhyaya, P.M., K.L. Ravikumar, and B.L. Umapathy, *Review of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen*. Indian J Med Microbiol, 2009. **27**(4): p. 301-5.
8. Paulsen, I.T., et al., *Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant Enterococcus faecalis*. Science, 2003. **299**(5615): p. 2071-4.
9. van Schaik, W., et al., *Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen Enterococcus faecium and identification of a large transferable pathogenicity island*. BMC Genomics, 2010. **11**: p. 239.
10. Oteo, J., et al., *Trends in antimicrobial resistance in 3469 enterococci isolated from blood (EARSS experience 2001-06, Spain): increasing ampicillin resistance in Enterococcus faecium*. J Antimicrob Chemother, 2007. **59**(5): p. 1044-5.
11. Rice, L.B., *Emergence of vancomycin-resistant enterococci*. Emerg Infect Dis, 2001. **7**(2): p. 183-7.
12. Top, J., R. Willems, and M. Bonten, *Emergence of CC17 Enterococcus faecium: from commensal to hospital-adapted pathogen*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008. **52**(3): p. 297-308.

13. Québec, C.s.l.i.n.d. *Mesures de prévention et contrôle de l'entérocoque résistant à la vancomycine dans les milieux de soins aigus du Québec*. 2012; Available from: <http://www.inspq.qc.ca>.
14. van den Bogaard, A.E. and E.E. Stobberingh, *Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans*. Int J Antimicrob Agents, 2000. **14**(4): p. 327-35.
15. Giraffa, G., *Enterococci from foods*. FEMS Microbiol Rev, 2002. **26**(2): p. 163-71.
16. Hammerum, A.M., C.H. Lester, and O.E. Heuer, *Antimicrobial-Resistant Enterococci in Animals and Meat: A Human Health Hazard?* Foodborne Pathog Dis, 2010. **7**(10): p. 1137-1146.
17. Hancock, L.E. and M.S. Gilmore, *Pathogenicity of Enterococci*, in *Gram-positive Pathogens*, Wiley-Blackwell, Editor. 2006, ASM Press: Washington D.C. p. 299-311.
18. Mangalappalli-Illathu, A., et al., *Dynamics of antimicrobial resistance and virulence genes in Enterococcus faecalis during swine manure storage*. Can J Microbiol, 2010. **56**(8): p. 683-91.
19. Hancock, L.E. and M. Perego, *The Enterococcus faecalis fsr two-component system controls biofilm development through production of gelatinase*. J Bacteriol, 2004. **186**(17): p. 5629-39.
20. Heikens, E., M.J. Bonten, and R.J. Willems, *Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of Enterococcus faecium E1162*. J Bacteriol, 2007. **189**(22): p. 8233-40.
21. Sood, S., et al., *Enterococcal infections & antimicrobial resistance*. Indian J Med Res, 2008. **128**(2): p. 111-21.
22. Cetinkaya, Y., P. Falk, and C.G. Mayhall, *Vancomycin-resistant enterococci*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(4): p. 686-707.
23. Huycke, M.M., D.F. Sahn, and M.S. Gilmore, *Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future*. Emerg Infect Dis, 1998. **4**(2): p. 239-49.

24. Jackson, C.R., et al., *Mechanisms of antimicrobial resistance and genetic relatedness among enterococci isolated from dogs and cats in the United States*. J Appl Microbiol, 2009. **108**(6): p. 2171-9.
25. Guardabassi, L., S. Schwarz, and D.H. Lloyd, *Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria*. J Antimicrob Chemother, 2004. **54**(2): p. 321-32.
26. Lester, C.H., et al., *In vivo transfer of the vanA resistance gene from an Enterococcus faecium isolate of animal origin to an E. faecium isolate of human origin in the intestines of human volunteers*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(2): p. 596-9.
27. Moubareck, C., et al., *Multiple antibiotic resistance gene transfer from animal to human enterococci in the digestive tract of gnotobiotic mice*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(9): p. 2993-6.
28. Donelli, G., et al., *Sex pheromone response, clumping, and slime production in enterococcal strains isolated from occluded biliary stents*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(8): p. 3419-27.
29. Hegstad, K., et al., *Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium*. Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(6): p. 541-54.
30. Cauwerts, K., et al., *High prevalence of tetracycline resistance in Enterococcus isolates from broilers carrying the erm(B) gene*. Avian Pathol, 2007. **36**(5): p. 395-9.
31. De Leener, E., et al., *Distribution of the erm (B) gene, tetracycline resistance genes, and Tn1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans*. Microb Drug Resist, 2004. **10**(4): p. 341-5.
32. Palmer, K.L., V.N. Kos, and M.S. Gilmore, *Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance*. Curr Opin Microbiol, 2010. **13**(5): p. 632-9.
33. Zheng, B., et al., *Isolation of VanB-type Enterococcus faecalis strains from nosocomial infections: first report of the isolation and identification of the pheromone-responsive plasmids pMG2200, Encoding VanB-type vancomycin*

- resistance and a Bac41-type bacteriocin, and pMG2201, encoding erythromycin resistance and cytolysin (Hly/Bac). *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. **53**(2): p. 735-47.
34. Dunny, G.M., M.H. Antiporta, and H. Hirt, *Peptide pheromone-induced transfer of plasmid pCF10 in Enterococcus faecalis: probing the genetic and molecular basis for specificity of the pheromone response*. *Peptides*, 2001. **22**(10): p. 1529-39.
 35. Chung, J.W., B.A. Bensing, and G.M. Dunny, *Genetic analysis of a region of the Enterococcus faecalis plasmid pCF10 involved in positive regulation of conjugative transfer functions*. *J Bacteriol*, 1995. **177**(8): p. 2107-17.
 36. Olmsted, S.B., et al., *Role of the pheromone-inducible surface protein Asc10 in mating aggregate formation and conjugal transfer of the Enterococcus faecalis plasmid pCF10*. *J Bacteriol*, 1991. **173**(23): p. 7665-72.
 37. Waters, C.M. and G.M. Dunny, *Analysis of functional domains of the Enterococcus faecalis pheromone-induced surface protein aggregation substance*. *J Bacteriol*, 2001. **183**(19): p. 5659-67.
 38. Klein, G., et al., *Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria*. *Int J Food Microbiol*, 1998. **41**(2): p. 103-25.
 39. Stiles, M.E. and W.H. Holzapfel, *Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy*. *Int J Food Microbiol*, 1997. **36**(1): p. 1-29.
 40. Klein, G., *Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract*. *Int J Food Microbiol*, 2003. **88**(2-3): p. 123-31.
 41. Saeedi, B., et al., *Modified pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of enterococci*. *APMIS*, 2002. **110**(12): p. 869-74.
 42. Foulquie Moreno, M.R., et al., *The role and application of enterococci in food and health*. *Int J Food Microbiol*, 2006. **106**(1): p. 1-24.
 43. Euzéby, J.P. *List of Prokaryotic names with standing in nomenclature : Genus Enterococcus*. 2010 [cited 1997; Available from: <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>].

44. Sistek, V., et al., *Two novel species, Enterococcus ureasiticus sp. nov. and Enterococcus quebecensis sp. nov., isolated from water*. Int J Syst Evol Microbiol, 2011.
45. Domig, K.J., H.K. Mayer, and W. Kneifel, *Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of Enterococcus spp. 2. Phenotypic and genotypic criteria*. International Journal of Food Microbiology, 2003. **88**: p. 165-188.
46. Shanks, O.C., J.W. Santo Domingo, and J.E. Graham, *Use of competitive DNA hybridization to identify differences in the genomes of bacteria*. Journal of Microbiological Methods, 2006. **66**(2): p. 321-330.
47. Facklam, R.R., M.G.S. Carvalho, and L.M. Teixeira, *History, Taxonomy, Biochemical Characteristics, and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci*, in *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*, M.S. Gilmore, Editor. 2002, ASM Press: Washington, D.C. p. 1-54.
48. Naser, S., et al., *Phylogeny and identification of Enterococci by atpA gene sequence analysis*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(5): p. 2224-30.
49. Dutka-Malen, S., S. Evers, and P. Courvalin, *Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(1): p. 24-7.
50. Teixeira, L. and R. Facklam, *Enterococcus*, in *Manual of Clinical Microbiology*. 2003. p. 422-433.
51. Salyers, A. and D. Whitt, *Bacterial pathogenesis : a molecular approach*. 2nd ed. 2001: ASM Press. 539.
52. Finegold, S.M. and V.L. Sutter, *Fecal flora in different populations, with special reference to diet*. Am J Clin Nutr, 1978. **31**(10 Suppl): p. S116-S122.
53. Sghir, A., et al., *Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(5): p. 2263-6.
54. Devriese, L.A. and B. Pot, *The genus Enterococcus*, in *The Lactic Acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria*, B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel, Editors.

- 1995, Blackie Academic and Professional: London, United Kingdom. p. 327-367.
55. Finegold, S.M., G.E. Mathisen, and W.L. George, *Changes in human intestinal flora related to the administration of antimicrobial agents*, in *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*, D.J. Hentges, Editor. 1983, Academic Press: New York. p. 356-446.
 56. Chenoweth, C. and D. Schaberg, *The epidemiology of enterococci*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1990. **9**(2): p. 80-9.
 57. Franz, C.M., W.H. Holzapfel, and M.E. Stiles, *Enterococci at the crossroads of food safety?* Int J Food Microbiol, 1999. **47**(1-2): p. 1-24.
 58. Tannock, G.W. and G. Cook, *Enterococci as Members of the Intestinal Microflora of Humans*, in *The Enterococci : pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*, M.S. Gilmore, Editor. 2002, ASM Press: Washington D.C. p. 101-132.
 59. Tannock, G.W., *The acquisition of the normal microflora of the gastrointestinal tract*, in *Human Health : the Contribution of Microorganisms*, S.A.W. Gibson, Editor. 1994, Springer-Verlag: London. p. 1-16.
 60. Woodmansey, E.J., *Intestinal bacteria and ageing*. J Appl Microbiol, 2007. **102**(5): p. 1178-86.
 61. Percival, R.S., P.D. Marsh, and S.J. Challacombe, *Serum antibodies to commensal oral and gut bacteria vary with age*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1996. **15**(1): p. 35-42.
 62. Devriese, L.A., et al., *Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry*. J Appl Bacteriol, 1991. **71**(1): p. 46-50.
 63. Devriese, L.A., et al., *Characterization and identification of Enterococcus species isolated from the intestines of animals*. International Journal of Systematic bacteriology, 1987. **37**: p. 257-259.
 64. Devriese, L.A., et al., *Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs*. J Appl Bacteriol, 1994. **77**(1): p. 31-6.

65. Aarestrup, F.M., P. Butaye, and W. Witte, *Nonhuman Reservoirs of Enterococci*, in *The Enterococci : pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*, M.S. Gilmore, Editor. 2002, ASM Press: Washington D.C. p. 55-100.
66. de Vaux, A., et al., *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). Int J Syst Bacteriol, 1998. **48 Pt 2**: p. 383-7.
67. Devriese, L.A., et al., *Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats*. J Appl Bacteriol, 1992. **73**(5): p. 421-5.
68. Devriese, L.A., et al., *Presence of vancomycin-resistant enterococci in farm and pet animals*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(10): p. 2285-7.
69. Saikia, P.K., et al., *Characterisation and antimicrobial susceptibility of Enterococcus species from the intestines of ducks in Assam*. Res Vet Sci, 1995. **58**(3): p. 288-9.
70. Martinez-Murcia, A.J. and M.D. Collins, *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. FEMS Microbiol Lett, 1991. **64**(1): p. 69-74.
71. Ulrich, A. and T. Muller, *Heterogeneity of plant-associated streptococci as characterized by phenotypic features and restriction analysis of PCR-amplified 16S rDNA*. J Appl Microbiol, 1998. **84**(2): p. 293-303.
72. Leclerc, H., L.A. Devriese, and D.A. Mossel, *Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water*. J Appl Bacteriol, 1996. **81**(5): p. 459-66.
73. Devriese, L.A., M. Baele, and P. Butaye, *The Genus Enterococcus*, in *The Prokaryotes*, S. Falkow, et al., Editors. 2006, Springer: New York. p. 163-174.
74. Murray, B.E., *The life and times of the Enterococcus*. Clin Microbiol Rev, 1990. **3**(1): p. 46-65.
75. Ogier, J.C. and P. Serror, *Safety assessment of dairy microorganisms: the Enterococcus genus*. Int J Food Microbiol, 2008. **126**(3): p. 291-301.
76. Willems, R.J. and M.J. Bonten, *Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity*. Curr Opin Infect Dis, 2007. **20**(4): p. 384-90.

77. Bourgogne, A., et al., *Large scale variation in Enterococcus faecalis illustrated by the genome analysis of strain OG1RF*. Genome Biol, 2008. **9**(7): p. R110.
78. Top, J., et al., *Ecological replacement of Enterococcus faecalis by multiresistant clonal complex 17 Enterococcus faecium*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(3): p. 316-9.
79. Treitman, A.N., et al., *Emerging incidence of Enterococcus faecium among hospital isolates (1993 to 2002)*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(1): p. 462-3.
80. Arias, C.A., G.A. Contreras, and B.E. Murray, *Management of multidrug-resistant enterococcal infections*. Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(6): p. 555-62.
81. Hidron, A.I., et al., *NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2008. **29**(11): p. 996-1011.
82. Werner, G., et al., *Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe*. Euro Surveill, 2008. **13**(47).
83. Leavis, H.L., M.J. Bonten, and R.J. Willems, *Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(5): p. 454-60.
84. Willems, R.J., et al., *Global spread of vancomycin-resistant Enterococcus faecium from distinct nosocomial genetic complex*. Emerg Infect Dis, 2005. **11**(6): p. 821-8.
85. Malani, P.N., C.A. Kauffman, and M.J. Zervos, *Enterococcal Disease, Epidemiology and Treatment*, in *The Enterococci : pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*, M.S. Gilmore, Editor. 2002, ASM Press: Washington D.C. p. 385-408.
86. Poh, C.H., H.M. Oh, and A.L. Tan, *Epidemiology and clinical outcome of enterococcal bacteraemia in an acute care hospital*. J Infect, 2006. **52**(5): p. 383-6.

87. Leavis, H.L., et al., *Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of E. faecium*. PLoS Pathog, 2007. **3**(1): p. e7.
88. Vancanneyt, M., et al., *Intraspecies genomic groups in Enterococcus faecium and their correlation with origin and pathogenicity*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(3): p. 1381-91.
89. Boyce, J.M., et al., *Outbreak of multidrug-resistant Enterococcus faecium with transferable vanB class vancomycin resistance*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(5): p. 1148-53.
90. Handwerger, S., et al., *Nosocomial outbreak due to Enterococcus faecium highly resistant to vancomycin, penicillin, and gentamicin*. Clin Infect Dis, 1993. **16**(6): p. 750-5.
91. Hayden, M.K., *Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci*. Clin Infect Dis, 2000. **31**(4): p. 1058-65.
92. Noskin, G.A., L.R. Peterson, and J.R. Warren, *Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis bacteremia: acquisition and outcome*. Clin Infect Dis, 1995. **20**(2): p. 296-301.
93. Mundy, L.M., D.F. Sahm, and M. Gilmore, *Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(4): p. 513-22.
94. Devriese, L.A., et al., *Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows*. Vet Microbiol, 1999. **70**(1-2): p. 87-94.
95. Cheon, D.S. and C. Chae, *Outbreak of diarrhea associated with Enterococcus durans in piglets*. J Vet Diagn Invest, 1996. **8**(1): p. 123-4.
96. Teixeira, L.M., et al., *Enterococcus porcinus sp. nov. and Enterococcus ratti sp. nov., associated with enteric disorders in animals*. Int J Syst Evol Microbiol, 2001. **51**(Pt 5): p. 1737-43.
97. Vancanneyt, M., et al., *Enterococcus villorum sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets*. Int J Syst Evol Microbiol, 2001. **51**(Pt 2): p. 393-400.

98. Kuhn, I., et al., *Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment--a European study*. Int J Food Microbiol, 2003. **88**(2-3): p. 133-45.
99. Busani, L., et al., *Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and -resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections*. Int J Food Microbiol, 2004. **97**(1): p. 17-22.
100. Ben Omar, N., et al., *Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods*. Syst Appl Microbiol, 2004. **27**(1): p. 118-30.
101. Hendrickx, A.P., et al., *LPxTG surface proteins of enterococci*. Trends Microbiol, 2009. **17**(9): p. 423-30.
102. Sillanpaa, J., et al., *Identification and phenotypic characterization of a second collagen adhesin, Scm, and genome-based identification and analysis of 13 other predicted MSCRAMMs, including four distinct pilus loci, in Enterococcus faecium*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 10): p. 3199-211.
103. Sillanpaa, J., et al., *A family of putative MSCRAMMs from Enterococcus faecalis*. Microbiology, 2004. **150**(Pt 7): p. 2069-78.
104. Kowalski, W.J., et al., *Enterococcus faecalis adhesin, Ace, mediates attachment to particulate dentin*. J Endod, 2006. **32**(7): p. 634-7.
105. Nallapareddy, S.R., et al., *Enterococcus faecalis adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I*. Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 5218-24.
106. Rich, R.L., et al., *Ace is a collagen-binding MSCRAMM from Enterococcus faecalis*. J Biol Chem, 1999. **274**(38): p. 26939-45.
107. Nallapareddy, S.R., K.V. Singh, and B.E. Murray, *Construction of improved temperature-sensitive and mobilizable vectors and their use for constructing mutations in the adhesin-encoding acm gene of poorly transformable clinical Enterococcus faecium strains*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(1): p. 334-45.
108. Nallapareddy, S.R., G.M. Weinstock, and B.E. Murray, *Clinical isolates of Enterococcus faecium exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acn, a new member of the MSCRAMM family*. Mol Microbiol, 2003. **47**(6): p. 1733-47.

109. Nallapareddy, S.R., et al., *A functional collagen adhesin gene, acm, in clinical isolates of Enterococcus faecium correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen*. Infect Immun, 2008. **76**(9): p. 4110-9.
110. Zong, Y., et al., *A 'Collagen Hug' model for Staphylococcus aureus CNA binding to collagen*. EMBO J, 2005. **24**(24): p. 4224-36.
111. Hall, A.E., et al., *Monoclonal antibodies recognizing the Enterococcus faecalis collagen-binding MSCRAMM Ace: conditional expression and binding analysis*. Microb Pathog, 2007. **43**(2-3): p. 55-66.
112. Hendrickx, A.P., et al., *LPxTG surface proteins of enterococci*. Trends Microbiol, 2009.
113. Hendrickx, A.P., et al., *SgrA, a nidogen-binding LPXTG surface adhesin implicated in biofilm formation, and EcbA, a collagen binding MSCRAMM, are two novel adhesins of hospital-acquired Enterococcus faecium*. Infect Immun, 2009. **77**(11): p. 5097-106.
114. Shankar, V., et al., *Infection-derived Enterococcus faecalis strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein*. Infect Immun, 1999. **67**(1): p. 193-200.
115. Baylan, O., et al., *[The relationship between antibiotic resistance and virulence factors in urinary Enterococcus isolates]*. Mikrobiyol Bul, 2011. **45**(3): p. 430-45.
116. Billstrom, H., et al., *Virulence and antimicrobial resistance in clinical Enterococcus faecium*. Int J Antimicrob Agents, 2008. **32**(5): p. 374-7.
117. Billstrom, H., A. Sullivan, and B. Lund, *Cross-transmission of clinical Enterococcus faecium in relation to esp and antibiotic resistance*. J Appl Microbiol, 2008. **105**(6): p. 2115-22.
118. Borgmann, S., et al., *Two episodes of vancomycin-resistant Enterococcus faecium outbreaks caused by two genetically different clones in a newborn intensive care unit*. Int J Hyg Environ Health, 2004. **207**(4): p. 386-9.
119. Leavis, H., et al., *A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of Enterococcus faecium and associated with epidemicity*. J Bacteriol, 2004. **186**(3): p. 672-82.

120. Cucarella, C., et al., *Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation*. J Bacteriol, 2001. **183**(9): p. 2888-96.
121. Michel, J.L., et al., *Large, identical, tandem repeating units in the C protein alpha antigen gene, bca, of group B streptococci*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10060-4.
122. Stalhammar-Carlemalm, M., et al., *The R28 protein of Streptococcus pyogenes is related to several group B streptococcal surface proteins, confers protective immunity and promotes binding to human epithelial cells*. Mol Microbiol, 1999. **33**(1): p. 208-19.
123. Stalhammar-Carlemalm, M., L. Stenberg, and G. Lindahl, *Protein rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections*. J Exp Med, 1993. **177**(6): p. 1593-603.
124. Lindahl, G., M. Stalhammar-Carlemalm, and T. Areschoug, *Surface proteins of Streptococcus agalactiae and related proteins in other bacterial pathogens*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(1): p. 102-27.
125. Tendolkar, P.M., et al., *Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by Enterococcus faecalis*. Infect Immun, 2004. **72**(10): p. 6032-9.
126. Latasa, C., et al., *Biofilm-associated proteins*. C R Biol, 2006. **329**(11): p. 849-57.
127. Tendolkar, P.M., A.S. Baghdayan, and N. Shankar, *The N-terminal domain of enterococcal surface protein, Esp, is sufficient for Esp-mediated biofilm enhancement in Enterococcus faecalis*. J Bacteriol, 2005. **187**(17): p. 6213-22.
128. Billstrom, H., et al., *Virulence and antimicrobial resistance in clinical Enterococcus faecium*. Int J Antimicrob Agents, 2008.
129. Mandlik, A., et al., *Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development*. Trends Microbiol, 2008. **16**(1): p. 33-40.
130. Handley, P.S. and A.E. Jacob, *Some structural and physiological properties of fimbriae of Streptococcus faecalis*. Journal of General Microbiology, 1981. **127**: p. 289-293.

131. Nallapareddy, S.R., et al., *Endocarditis and biofilm-associated pili of Enterococcus faecalis*. J Clin Invest, 2006. **116**(10): p. 2799-807.
132. Tendolkar, P.M., A.S. Baghdayan, and N. Shankar, *Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to Enterococcus faecalis*. J Bacteriol, 2006. **188**(6): p. 2063-72.
133. Cobo Molinos, A., et al., *Detection of ebp (endocarditis- and biofilm-associated pilus) genes in enterococcal isolates from clinical and non-clinical origin*. Int J Food Microbiol, 2008. **126**(1-2): p. 123-6.
134. Hendrickx, A.P., et al., *Expression of two distinct types of pili by a hospital-acquired Enterococcus faecium isolate*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 10): p. 3212-23.
135. Galloway-Pena, J.R., et al., *Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of Enterococcus faecium in the United States*. J Infect Dis, 2009. **200**(10): p. 1566-73.
136. Bourgogne, A., et al., *EbpR is important for biofilm formation by activating expression of the endocarditis and biofilm-associated pilus operon (ebpABC) of Enterococcus faecalis OG1RF*. J Bacteriol, 2007. **189**(17): p. 6490-3.
137. Hernday, A., et al., *Self-perpetuating epigenetic pili switches in bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99 Suppl 4**: p. 16470-6.
138. Kemp, K.D., et al., *Relative contributions of Enterococcus faecalis OG1RF sortase-encoding genes, srtA and bps (srtC), to biofilm formation and a murine model of urinary tract infection*. Infect Immun, 2007. **75**(11): p. 5399-404.
139. Singh, K.V., S.R. Nallapareddy, and B.E. Murray, *Importance of the ebp (endocarditis- and biofilm-associated pilus) locus in the pathogenesis of Enterococcus faecalis ascending urinary tract infection*. J Infect Dis, 2007. **195**(11): p. 1671-7.
140. Horn, D.L., et al., *What are the microbial components implicated in the pathogenesis of sepsis? Report on a symposium*. Clinical Infectious Diseases, 2000. **31**(4): p. 851-858.

141. Opal, S.M. and J. Cohen, *Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis?* Crit Care Med, 1999. **27**(8): p. 1608-16.
142. Sriskandan, S. and J. Cohen, *Gram-positive sepsis. Mechanisms and differences from gram-negative sepsis.* Infect Dis Clin North Am, 1999. **13**(2): p. 397-412.
143. Wicken, A.J., S.D. Elliott, and J. Baddiley, *The identity of streptococcal group D antigen with teichoic acid.* J Gen Microbiol, 1963. **31**: p. 231-9.
144. Kayaoglu, G. and D. Orstavik, *Virulence factors of Enterococcus faecalis: relationship to endodontic disease.* Crit Rev Oral Biol Med, 2004. **15**(5): p. 308-20.
145. Fisher, W., *Lipoteichoic acids and Lipoglycans.*, in *Bacterial cell wall*, J.M. Ghuysen and R. Hakenbeck, Editors. 1994, Elsevier, Amsterdam: New York. p. 199-215.
146. Bhakdi, S., et al., *Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids.* Infect Immun, 1991. **59**(12): p. 4614-20.
147. Saetre, T., et al., *Aminoethyl-isothiourea inhibits leukocyte production of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines induced by streptococcal cell wall components in human whole blood.* Shock, 2001. **15**(6): p. 455-60.
148. Card, G.L., R.R. Jasuja, and G.L. Gustafson, *Activation of arachidonic acid metabolism in mouse macrophages by bacterial amphiphiles.* J Leukoc Biol, 1994. **56**(6): p. 723-8.
149. Harrop, P.J., et al., *Stimulation of lysosomal enzyme release from macrophages by lipoteichoic acid.* J Periodontal Res, 1980. **15**(5): p. 492-501.
150. Levy, R., et al., *Stimulation of oxidative burst in human monocytes by lipoteichoic acids.* Infect Immun, 1990. **58**(2): p. 566-8.
151. Cleveland, R.F., et al., *Effect of lipoteichoic acid and lipids on lysis of intact cells of Streptococcus faecalis.* J Bacteriol, 1976. **127**(3): p. 1582-4.
152. Ehrenfeld, E.E., R.E. Kessler, and D.B. Clewell, *Identification of pheromone-induced surface proteins in Streptococcus faecalis and evidence of a role for lipoteichoic acid in formation of mating aggregates.* J Bacteriol, 1986. **168**(1): p. 6-12.

153. Bensing, B.A. and G.M. Dunny, *Cloning and molecular analysis of genes affecting expression of binding substance, the recipient-encoded receptor(s) mediating mating aggregate formation in Enterococcus faecalis*. J Bacteriol, 1993. **175**(22): p. 7421-9.
154. Trotter, K.M. and G.M. Dunny, *Mutants of Enterococcus faecalis deficient as recipients in mating with donors carrying pheromone-inducible plasmids*. Plasmid, 1990. **24**(1): p. 57-67.
155. Chandler, J.R., H. Hirt, and G.M. Dunny, *A paracrine peptide sex pheromone also acts as an autocrine signal to induce plasmid transfer and virulence factor expression in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15617-22.
156. Kozlowicz, B.K., M. Dworkin, and G.M. Dunny, *Pheromone-inducible conjugation in Enterococcus faecalis: a model for the evolution of biological complexity?* Int J Med Microbiol, 2006. **296**(2-3): p. 141-7.
157. Galli, D., F. Lottspeich, and R. Wirth, *Sequence analysis of Enterococcus faecalis aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1*. Mol Microbiol, 1990. **4**(6): p. 895-904.
158. Isenmann, R., et al., *Interaction of fibronectin and aggregation substance promotes adherence of Enterococcus faecalis to human colon*. Dig Dis Sci, 2002. **47**(2): p. 462-8.
159. Kreft, B., et al., *Aggregation substance of Enterococcus faecalis mediates adhesion to cultured renal tubular cells*. Infect Immun, 1992. **60**(1): p. 25-30.
160. Waters, C.M., et al., *An amino-terminal domain of Enterococcus faecalis aggregation substance is required for aggregation, bacterial internalization by epithelial cells and binding to lipoteichoic acid*. Mol Microbiol, 2004. **52**(4): p. 1159-71.
161. Wirth, R., *The sex pheromone system of Enterococcus faecalis. More than just a plasmid-collection mechanism?* Eur J Biochem, 1994. **222**(2): p. 235-46.
162. Hirt, H., et al., *Biochemical, immunological and ultrastructural characterization of aggregation substances encoded by Enterococcus faecalis sex-pheromone plasmids*. Eur J Biochem, 1993. **211**(3): p. 711-6.

163. Sartingen, S., et al., *Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of Enterococcus faecalis through different intestinal epithelial cells in vitro*. Infect Immun, 2000. **68**(10): p. 6044-7.
164. Wells, C.L., et al., *Inducible expression of Enterococcus faecalis aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes*. Infect Immun, 2000. **68**(12): p. 7190-4.
165. Rakita, R.M., et al., *Enterococcus faecalis bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation*. Infect Immun, 1999. **67**(11): p. 6067-75.
166. Vanek, N.N., et al., *Enterococcus faecalis aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1999. **26**(1): p. 49-60.
167. Sussmuth, S.D., et al., *Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of Enterococcus faecalis within human macrophages and suppresses respiratory burst*. Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 4900-6.
168. Rozdzinski, E., et al., *Aggregation substance-mediated adherence of Enterococcus faecalis to immobilized extracellular matrix proteins*. Microb Pathog, 2001. **30**(4): p. 211-20.
169. Johnson, J.R., et al., *Enterococcal aggregation substance and binding substance are not major contributors to urinary tract colonization by Enterococcus faecalis in a mouse model of ascending unobstructed urinary tract infection*. Infect Immun, 2004. **72**(4): p. 2445-8.
170. Chuang, O.N., et al., *Multiple functional domains of Enterococcus faecalis aggregation substance Asc10 contribute to endocarditis virulence*. Infect Immun, 2009. **77**(1): p. 539-48.
171. McCormick, J.K., et al., *Antibodies to a surface-exposed, N-terminal domain of aggregation substance are not protective in the rabbit model of Enterococcus faecalis infective endocarditis*. Infect Immun, 2001. **69**(5): p. 3305-14.

172. Koch, S., et al., *Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities*. Vaccine, 2004. **22**(7): p. 822-30.
173. Shankar, N., A.S. Baghdayan, and M.S. Gilmore, *Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant Enterococcus faecalis*. Nature, 2002. **417**(6890): p. 746-50.
174. Coburn, P.S. and M.S. Gilmore, *The Enterococcus faecalis cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells*. Cell Microbiol, 2003. **5**(10): p. 661-9.
175. Haas, W., B.D. Shepard, and M.S. Gilmore, *Two-component regulator of Enterococcus faecalis cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction*. Nature, 2002. **415**(6867): p. 84-7.
176. Budzik, J.M. and O. Schneewind, *Pili prove pertinent to enterococcal endocarditis*. J Clin Invest, 2006. **116**(10): p. 2582-4.
177. Gilmore, M.S., et al., *Enterococcal Virulence*, in *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*, M.S. Gilmore, Editor. 2002, ASM Press: Washington, D.C. p. 301-354.
178. Haas, W., B.D. Shepard, and M.S. Gilmore, *Novel Two-component regulator of Enterococcus faecalis cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction*. Nature, 2002. **415**: p. 84-87.
179. Chow, J.W., et al., *Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(11): p. 2474-7.
180. Garsin, D.A., et al., *A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10892-7.
181. Ike, Y., H. Hashimoto, and D.B. Clewell, *Hemolysin of Streptococcus faecalis subspecies zymogenes contributes to virulence in mice*. Infect Immun, 1984. **45**(2): p. 528-30.
182. Jett, B.D., et al., *Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental Enterococcus faecalis endophthalmitis*. Infect Immun, 1992. **60**(6): p. 2445-52.

183. Singh, K.V., et al., *In vivo testing of an Enterococcus faecalis efaA mutant and use of efaA homologs for species identification*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1998. **21**(4): p. 323-31.
184. Stevens, S.X., et al., *A hemolysin-encoding plasmid contributes to bacterial virulence in experimental Enterococcus faecalis endophthalmitis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992. **33**(5): p. 1650-6.
185. Huycke, M.M., C.A. Spiegel, and M.S. Gilmore, *Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother, 1991. **35**(8): p. 1626-34.
186. Ike, Y., H. Hashimoto, and D.B. Clewell, *High incidence of hemolysin production by Enterococcus (Streptococcus) faecalis strains associated with human parenteral infections*. J Clin Microbiol, 1987. **25**(8): p. 1524-8.
187. Wells, C.L., R.P. Jechorek, and S.L. Erlandsen, *Evidence for the translocation of Enterococcus faecalis across the mouse intestinal tract*. J Infect Dis, 1990. **162**(1): p. 82-90.
188. Gilmore, M.S., et al., *Genetic structure of the Enterococcus faecalis plasmid pADI-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants*. J Bacteriol, 1994. **176**(23): p. 7335-44.
189. Garneau, S., N.I. Martin, and J.C. Vederas, *Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. Biochimie, 2002. **84**(5-6): p. 577-92.
190. Van den Berghe, E., T. De Winter, and L. De Vuyst, *Enterocin A production by Enterococcus faecium FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion*. Int J Food Microbiol, 2006. **107**(2): p. 159-70.
191. Campos, C.A., et al., *Preliminary characterization of bacteriocins from Lactococcus lactis, Enterococcus faecium and Enterococcus mundtii strains isolated from turbot (Psetta maxima)*. Food Research International, 2006. **39**: p. 356-364.
192. De Kwaadsteniet, M., et al., *Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by Enterococcus mundtii ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria*. Int J Food Microbiol, 2005. **105**(3): p. 433-44.

193. Leroy, F., M.R. Foulquie Moreno, and L. De Vuyst, *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *Int J Food Microbiol*, 2003. **88**(2-3): p. 235-40.
194. Garcia, M.T., et al., *Inhibition of Listeria monocytogenes by enterocin EJ97 produced by Enterococcus faecalis EJ97*. *Int J Food Microbiol*, 2004. **90**(2): p. 161-70.
195. Lucas, R., et al., *Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit Bacillus coagulans in canned fruit and vegetable foods*. *Food Chem Toxicol*, 2006. **44**(10): p. 1774-81.
196. Hechard, Y. and H.G. Sahl, *Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria*. *Biochimie*, 2002. **84**(5-6): p. 545-57.
197. Yamashita, H., et al., *Genetic organization and mode of action of a novel bacteriocin, bacteriocin 51: determinant of VanA-type vancomycin-resistant Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. **55**(9): p. 4352-60.
198. Ike, Y., et al., *Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in Enterococcus faecalis: Tn917 insertional mutagenesis and cloning*. *J Bacteriol*, 1990. **172**(1): p. 155-63.
199. Todokoro, D., et al., *Genetic analysis of bacteriocin 43 of vancomycin-resistant Enterococcus faecium*. *Appl Environ Microbiol*, 2006. **72**(11): p. 6955-64.
200. Tomita, H., et al., *Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the Enterococcus faecalis pheromone-responsive conjugative plasmid pYII7*. *J Bacteriol*, 1996. **178**(12): p. 3585-93.
201. Tomita, H., et al., *Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the Enterococcus faecalis pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1*. *J Bacteriol*, 1997. **179**(24): p. 7843-55.
202. Mohamed, J.A. and D.B. Huang, *Biofilm formation by enterococci*. *J Med Microbiol*, 2007. **56**(Pt 12): p. 1581-8.
203. Plaut, M., G. Marone, and E. Gillespie, *The role of cyclic AMP in modulating cytotoxic T lymphocytes. II. Sequential changes during culture in responsiveness of cytotoxic lymphocytes to cyclic AMP-active agents*. *J Immunol*, 1983. **131**(6): p. 2945-52.

204. Prokesova, L., et al., *Cleavage of human immunoglobulins by serine proteinase from Staphylococcus aureus*. Immunol Lett, 1992. **31**(3): p. 259-65.
205. Duesbery, N.S., et al., *Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor*. Science, 1998. **280**(5364): p. 734-7.
206. Tashiro, M., et al., *Role of Staphylococcus protease in the development of influenza pneumonia*. Nature, 1987. **325**(6104): p. 536-7.
207. McGavin, M.J., et al., *Modification of the Staphylococcus aureus fibronectin binding phenotype by V8 protease*. Infect Immun, 1997. **65**(7): p. 2621-8.
208. Lantz, M.S., et al., *Specific cell components of Bacteroides gingivalis mediate binding and degradation of human fibrinogen*. J Bacteriol, 1991. **173**(2): p. 495-504.
209. Ashbaugh, C.D., et al., *Molecular analysis of the role of the group A streptococcal cysteine protease, hyaluronic acid capsule, and M protein in a murine model of human invasive soft-tissue infection*. J Clin Invest, 1998. **102**(3): p. 550-60.
210. Garcia de Fernando, G.D., et al., *Extracellular proteinase from Enterococcus faecalis subsp. liquefaciens. II. Partial purification and some technological important properties*. Folia Microbiol (Praha), 1991. **36**(5): p. 429-36.
211. Waters, C.M., et al., *Role of the Enterococcus faecalis GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins*. J Bacteriol, 2003. **185**(12): p. 3613-23.
212. Thomas, V.C., et al., *A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of Enterococcus faecalis*. Mol Microbiol, 2009. **72**(4): p. 1022-36.
213. Kuhnen, E., et al., *Establishment of a typing system for group D streptococci*. Zentralbl Bakteriол Mikrobiol Hyg A, 1988. **267**(3): p. 322-30.
214. Dupont, H., et al., *Disparate findings on the role of virulence factors of Enterococcus faecalis in mouse and rat models of peritonitis*. Infect Immun, 1998. **66**(6): p. 2570-5.

215. Mohamed, J.A., et al., *Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by Enterococcus faecalis*. Infect Immun, 2004. **72**(6): p. 3658-63.
216. Coque, T.M., et al., *Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons*. J Infect Dis, 1995. **171**(5): p. 1223-9.
217. Thurlow, L.R., et al., *Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by Enterococcus faecalis*. Infect Immun, 2010. **78**(11): p. 4936-43.
218. Eaton, T.J. and M.J. Gasson, *Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(4): p. 1628-35.
219. Lopes Mde, F., et al., *Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci*. Int J Food Microbiol, 2006. **112**(3): p. 208-14.
220. Qin, X., et al., *Effects of Enterococcus faecalis fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence*. Infect Immun, 2000. **68**(5): p. 2579-86.
221. Peng, H.L., et al., *Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (agr) in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 1988. **170**(9): p. 4365-72.
222. Cheung, A.L., K. Eberhardt, and J.H. Heinrichs, *Regulation of protein A synthesis by the sar and agr loci of Staphylococcus aureus*. Infect Immun, 1997. **65**(6): p. 2243-9.
223. Kornblum, J., et al., *agr: a polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in Staphylococcus aureus.*, in *Molecular Biology of the Staphylococci*. 1990, VCH: New York. p. 373-402.
224. Lebeau, C., et al., *Coagulase expression in Staphylococcus aureus is positively and negatively modulated by an agr-dependent mechanism*. J Bacteriol, 1994. **176**(17): p. 5534-6.
225. Vankerckhoven, V., et al., *Development of a multiplex PCR for the detection of asa1, gelE, cylA, esp, and hyl genes in enterococci and survey for virulence*

- determinants among European hospital isolates of Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(10): p. 4473-9.
226. Freitas, A.R., et al., *Global spread of the hyl(Efm) colonization-virulence gene in megaplasms of the Enterococcus faecium CC17 polyclonal subcluster*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(6): p. 2660-5.
 227. Cross, C.E., et al., *Oxygen radicals and human disease*. Ann Intern Med, 1987. **107**(4): p. 526-45.
 228. Huycke, M.M., W. Joyce, and M.F. Wack, *Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of Enterococcus faecalis*. J Infect Dis, 1996. **173**(3): p. 743-6.
 229. Huycke, M.M. and M.S. Gilmore, *In vivo survival of Enterococcus faecalis is enhanced by extracellular superoxide production*. Adv Exp Med Biol, 1997. **418**: p. 781-4.
 230. Thakker, M., et al., *Staphylococcus aureus serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model*. Infect Immun, 1998. **66**(11): p. 5183-9.
 231. Maekawa, S., M. Yoshioka, and Y. Kumamoto, *Proposal of a new scheme for the serological typing of Enterococcus faecalis strains*. Microbiol Immunol, 1992. **36**(7): p. 671-81.
 232. Arduino, R.C., B.E. Murray, and R.M. Rakita, *Roles of antibodies and complement in phagocytic killing of enterococci*. Infect Immun, 1994. **62**(3): p. 987-93.
 233. Huebner, J., et al., *Isolation and chemical characterization of a capsular polysaccharide antigen shared by clinical isolates of Enterococcus faecalis and vancomycin-resistant Enterococcus faecium*. Infect Immun, 1999. **67**(3): p. 1213-9.
 234. Hufnagel, M., et al., *Serological and genetic diversity of capsular polysaccharides in Enterococcus faecalis*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(6): p. 2548-57.

235. Hancock, L.E., B.D. Shepard, and M.S. Gilmore, *Molecular analysis of the Enterococcus faecalis serotype 2 polysaccharide determinant*. J Bacteriol, 2003. **185**(15): p. 4393-401.
236. Thurlow, L.R., V.C. Thomas, and L.E. Hancock, *Capsular polysaccharide production in Enterococcus faecalis and contribution of CpsF to capsule serospecificity*. J Bacteriol, 2009. **191**(20): p. 6203-10.
237. Bottone, E.J., *Encapsulated Enterococcus faecalis: role of encapsulation in persistence in mouse peritoneum in absence of mouse lethality*. Diagn Microbiol Infect Dis, 1999. **33**(1): p. 65-8.
238. McBride, S.M., et al., *Genetic diversity among Enterococcus faecalis*. PLoS One, 2007. **2**(7): p. e582.
239. Hufnagel, M. and J. Huebner, *Analysis of the specific immune response against capsular polysaccharides of two patients with systemic enterococcal infections*. Infection, 2005. **33**(5-6): p. 373-6.
240. Teng, F., et al., *Evidence that the enterococcal polysaccharide antigen gene (epa) cluster is widespread in Enterococcus faecalis and influences resistance to phagocytic killing of E. faecalis*. Infect Immun, 2002. **70**(4): p. 2010-5.
241. Xu, Y., B.E. Murray, and G.M. Weinstock, *A cluster of genes involved in polysaccharide biosynthesis from Enterococcus faecalis OG1RF*. Infect Immun, 1998. **66**(9): p. 4313-23.
242. Baldassarri, L., et al., *Enterococcus spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages*. Med Microbiol Immunol, 2001. **190**(3): p. 113-20.
243. Toledo-Arana, A., et al., *The enterococcal surface protein, Esp, is involved in Enterococcus faecalis biofilm formation*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(10): p. 4538-45.
244. Dupre, I., et al., *Incidence of virulence determinants in clinical Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis isolates collected in Sardinia (Italy)*. J Med Microbiol, 2003. **52**(Pt 6): p. 491-8.
245. Sandoe, J.A., et al., *Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo*. J Med Microbiol, 2003. **52**(Pt 7): p. 547-50.

246. Dworniczek, E., et al., *Virulence of Enterococcus isolates collected in Lower Silesia (Poland)*. Scand J Infect Dis, 2005. **37**(9): p. 630-6.
247. Ramadhan, A.A. and E. Hegedus, *Biofilm formation and esp gene carriage in enterococci*. J Clin Pathol, 2005. **58**(7): p. 685-6.
248. van Merode, A.E., et al., *Influence of culture heterogeneity in cell surface charge on adhesion and biofilm formation by Enterococcus faecalis*. J Bacteriol, 2006. **188**(7): p. 2421-6.
249. Schluter, S., et al., *The high biofilm-encoding Bee locus: a second pilus gene cluster in Enterococcus faecalis?* Curr Microbiol, 2009. **59**(2): p. 206-11.
250. de Jong, A., et al., *A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals*. J Antimicrob Chemother, 2009. **63**(4): p. 733-44.
251. Martins da Costa, P., et al., *Field trial evaluating changes in prevalence and patterns of antimicrobial resistance among Escherichia coli and Enterococcus spp. isolated from growing broilers medicated with enrofloxacin, apramycin and amoxicillin*. Vet Microbiol, 2009.
252. Canada, A.d.I.S.P.d. 2007; Available from: <http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/index-fra.php>.
253. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Approved Standard- Twentieth Informational Supplement*. CLSI document M 100-S20, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. **Vol. 31 No. 1**.
254. Archambault, M., *Évaluation de l'impact de l'interdiction des antimicrobiens comme promoteurs de croissance et de la modification de l'utilisation des antimicrobiens comme moyens thérapeutiques et préventifs en médecine vétérinaire*. 2004, Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire: Saint-Hyacinthe. p. 1-35.
255. Anonymous, *Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA)*. 2006, Agence de la santé publique du Canada: Guelph. p. 37.

256. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Third Edition*. CLSI document M31-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. **Vol. 28 No.8**.
257. Anonymous. *Lignes directrices pour l'évaluation de la sensibilité des Enterobacteriaceae résistants aux antibiotiques à cause des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et le signalement des cas*. 2002 16 juillet 2012]; Available from: <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ceqa-pceeq/esbl98-fra.php>.
258. Bradford, P.A., *Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4): p. 933-51, table of contents.
259. Fluit, A.C., *Genetic Methods for Detecting Bacterial Resistance Genes*, in *Bacterial Resistance to Antimicrobials*, L.K. Wax R.G., Salyers A.A., Taber H, Editor. 2008, CRC Press. p. 183-227.
260. Espy, M.J., et al., *Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(1): p. 165-256.
261. Aslam, M., et al., *Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in Enterococcus spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada*. Int J Food Microbiol, 2012.
262. Bonnet, C., et al., *Pathotype and antibiotic resistance gene distributions of Escherichia coli isolates from broiler chickens raised on antimicrobial-supplemented diets*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(22): p. 6955-62.
263. Champagne, J., et al., *Development of a DNA microarray for enterococcal species, virulence, and antibiotic resistance gene determinations among isolates from poultry*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(8): p. 2625-33.
264. Diarra, M.S., et al., *Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in Enterococcus spp: Characterization of Isolates from Broiler Chickens*. Appl Environ Microbiol, 2010.
265. Frye, J.G., et al., *Related Antimicrobial Resistance Genes Detected in Different Bacterial Species Co-isolated from Swine Fecal Samples*. Foodborne Pathog Dis, 2011.

266. Garneau, P., et al., *Use of a bacterial antimicrobial resistance gene microarray for the identification of resistant Staphylococcus aureus*. Zoonoses Public Health, 2010. **57 Suppl 1**: p. 94-9.
267. Perreten, V., et al., *Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(5): p. 2291-302.
268. Frye, J.G., et al., *Development of a DNA microarray to detect antimicrobial resistance genes identified in the National Center for Biotechnology Information database*. Microb Drug Resist, 2009. **16**(1): p. 9-19.
269. *Bacterial Resistance to Antimicrobials*. Second ed, ed. L.K. Wax R.G., Salyers A.A., Taber H. 2008, Boca Raton, FL: CRC Press.
270. Monier, J.M., et al., *Metagenomic exploration of antibiotic resistance in soil*. Curr Opin Microbiol, 2011. **14**(3): p. 229-35.
271. Tenover, F.C., *Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria*. Am J Infect Control, 2006. **34**(5 Suppl 1): p. S3-10; discussion S64-73.
272. Poole, K. and R. Srikumar, *Multidrug efflux in Pseudomonas aeruginosa: components, mechanisms and clinical significance*. Curr Top Med Chem, 2001. **1**(1): p. 59-71.
273. Schweizer, H.P., *Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in Pseudomonas aeruginosa and related bacteria: unanswered questions*. Genet Mol Res, 2003. **2**(1): p. 48-62.
274. Philippon, A. *Cours de Bactériologie Générale - Génétique bactérienne II*. Bactériologie Médicale 2000 [cited Janvier 2000; Available from: <http://www.microbe-edu.org/etudiant/gene2.html>].
275. Salyers, A.A. and D.D. Whitt, *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach*. 2nd ed. 2001, Washington, D.C.: ASM Press. 539.
276. *The Merck Veterinary Manual*. Ninth ed, ed. C.M. Kahn and L. Scott. 2005: Merck & Co. Inc.
277. Stokestad, E.L.R. and T.H. Jukes, *Further observations on the "animal protein factor"*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1950. **73**: p. 523-528.

278. McEwen, S., *L'utilisation au Canada d'antimicrobiens chez les animaux destinés à l'alimentation: les conséquences pour la résistance et la santé humaine*. 2002, Collège de médecine vétérinaire de l'Ontario, University of Guelph: Ontario. p. 200.
279. Anonymous. *Bio-Agri-Mix (BAM) Total Solutions, Compendium of Veterinary Products*. 2010
[cited 2010, November 20th]; Available from:
<http://bam.naccvp.com/?u=country&p=msds>.
280. Davies, J. and D. Davies, *Origins and evolution of antibiotic resistance*. Microbiol Mol Biol Rev, 2010. **74**(3): p. 417-33.
281. Forsman, M., et al., *Molecular analysis of beta-lactamases from four species of Streptomyces: comparison of amino acid sequences with those of other beta-lactamases*. J Gen Microbiol, 1990. **136**(3): p. 589-98.
282. Ogawara, H., et al., *Distribution of beta-lactamases in actinomycetes*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(12): p. 3014-7.
283. Petkovic, H., et al., *Genetics of Streptomyces rimosus, the oxytetracycline producer*. Microbiol Mol Biol Rev, 2006. **70**(3): p. 704-28.
284. Benveniste, R. and J. Davies, *Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(8): p. 2276-80.
285. D'Costa, V.M., et al., *Sampling the antibiotic resistome*. Science, 2006. **311**(5759): p. 374-7.
286. Wright, G.D., *The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(3): p. 175-86.
287. Canton, R., *Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting*. Clin Microbiol Infect, 2009. **15 Suppl 1**: p. 20-5.
288. *Molecular Genetics of Bacteria*. Third ed, ed. L. Snyder and W. Champness. 2007, Washington, D.C.: ASM Press.
289. Facklam, R., *Enterococci*, in *Manual of Clinical Microbiology*. 2005, ASM Press: Washington.

290. Levy, S.B. and B. Marshall, *Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses*. Nat Med, 2004. **10**(12 Suppl): p. S122-9.
291. Grohmann, E., G. Muth, and M. Espinosa, *Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria*. Microbiol Mol Biol Rev, 2003. **67**(2): p. 277-301, table of contents.
292. Dunny, G.M., B.L. Brown, and D.B. Clewell, *Induced cell aggregation and mating in Streptococcus faecalis: evidence for a bacterial sex pheromone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(7): p. 3479-83.
293. Yagi, Y., et al., *Plasmid content of Streptococcus faecalis strain 39-5 and identification of a pheromone (cPDI)-induced surface antigen*. J Gen Microbiol, 1983. **129**(4): p. 1207-15.
294. Mori, M., et al., *Isolation and structure of the Streptococcus faecalis sex pheromone, cAM373*. FEBS Lett, 1986. **206**(1): p. 69-72.
295. Clewell, D.B., *Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer*. Cell, 1993. **73**(1): p. 9-12.
296. Wardal, E., E. Sadowy, and W. Hryniewicz, *Complex nature of enterococcal pheromone-responsive plasmids*. Pol J Microbiol, 2010. **59**(2): p. 79-87.
297. Clewell, D.B., *Properties of Enterococcus faecalis plasmid pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytolysin*. Plasmid, 2007. **58**(3): p. 205-27.
298. Francia, M.V. and D.B. Clewell, *Transfer origins in the conjugative Enterococcus faecalis plasmids pAD1 and pAM373: identification of the pAD1 nic site, a specific relaxase and a possible TraG-like protein*. Mol Microbiol, 2002. **45**(2): p. 375-95.
299. Hirt, H., R. Wirth, and A. Muscholl, *Comparative analysis of 18 sex pheromone plasmids from Enterococcus faecalis: detection of a new insertion element on pPDI and implications for the evolution of this plasmid family*. Mol Gen Genet, 1996. **252**(6): p. 640-7.
300. Muscholl-Silberhorn, A., *Cloning and functional analysis of Asa373, a novel adhesin unrelated to the other sex pheromone plasmid-encoded aggregation substances of Enterococcus faecalis*. Mol Microbiol, 1999. **34**(3): p. 620-30.

301. De Boever, E.H. and D.B. Clewell, *The Enterococcus faecalis pheromone-responsive plasmid pAM373 does not encode an entry exclusion function*. Plasmid, 2001. **45**(1): p. 57-60.
302. Clewell, D.B. and G.M. Dunny, *Conjugation and genetic exchange in enterococci*, in *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*, M.S. Gilmore, Editor. 2002, ASM Press: Washington, D.C. p. 265-300.
303. Licht, T.R., et al., *Effect of pheromone induction on transfer of the Enterococcus faecalis plasmid pCF10 in intestinal mucus ex vivo*. FEMS Microbiol Lett, 2001. **204**(2): p. 305-9.
304. Licht, T.R., et al., *Transfer of the pheromone-inducible plasmid pCF10 among Enterococcus faecalis microorganisms colonizing the intestine of mini-pigs*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(1): p. 187-93.
305. Clewell, D.B., et al., *Enterococcal sex pheromone precursors are part of signal sequences for surface lipoproteins*. Mol Microbiol, 2000. **35**(1): p. 246-7.
306. An, F.Y. and D.B. Clewell, *Identification of the cAD1 sex pheromone precursor in Enterococcus faecalis*. J Bacteriol, 2002. **184**(7): p. 1880-7.
307. Brown, M.S., et al., *Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans*. Cell, 2000. **100**(4): p. 391-8.
308. Clewell, D.B., et al., *Nucleotide sequence of the sex pheromone inhibitor (iAD1) determinant of Enterococcus faecalis conjugative plasmid pAD1*. Plasmid, 1990. **24**(2): p. 156-61.
309. An, F.Y., M.C. Sulavik, and D.B. Clewell, *Identification and characterization of a determinant (eep) on the Enterococcus faecalis chromosome that is involved in production of the peptide sex pheromone cAD1*. J Bacteriol, 1999. **181**(19): p. 5915-21.
310. Clewell, D.B., et al., *Streptococcus faecalis sex pheromone (cAM373) also produced by Staphylococcus aureus and identification of a conjugative transposon (Tn918)*. J Bacteriol, 1985. **162**(3): p. 1212-20.

311. Flannagan, S.E. and D.B. Clewell, *Identification and characterization of genes encoding sex pheromone cAM373 activity in Enterococcus faecalis and Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol, 2002. **44**(3): p. 803-17.
312. Pontius, L.T. and D.B. Clewell, *Conjugative transfer of Enterococcus faecalis plasmid pAD1: nucleotide sequence and transcriptional fusion analysis of a region involved in positive regulation*. J Bacteriol, 1992. **174**(10): p. 3152-60.
313. Tomita, H. and D.B. Clewell, *A pAD1-encoded small RNA molecule, mD, negatively regulates Enterococcus faecalis pheromone response by enhancing transcription termination*. J Bacteriol, 2000. **182**(4): p. 1062-73.
314. Callen, B.P., K.E. Shearwin, and J.B. Egan, *Transcriptional interference between convergent promoters caused by elongation over the promoter*. Mol Cell, 2004. **14**(5): p. 647-56.
315. Fujimoto, S. and D.B. Clewell, *Regulation of the pAD1 sex pheromone response of Enterococcus faecalis by direct interaction between the cAD1 peptide mating signal and the negatively regulating, DNA-binding TraA protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6430-5.
316. Austin, D.J., K.G. Kristinsson, and R.M. Anderson, *The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(3): p. 1152-6.
317. Bergstrom, C.T., M. Lipsitch, and B.R. Levin, *Natural selection, infectious transfer and the existence conditions for bacterial plasmids*. Genetics, 2000. **155**(4): p. 1505-19.
318. Dagan, R., et al., *Seasonality of antibiotic-resistant Streptococcus pneumoniae that causes acute otitis media: a clue for an antibiotic-restriction policy?* J infect Dis, 2008. **197**: p. 1094-1102.
319. Enne, V.I., et al., *Persistence of sulphonamide resistance in Escherichia coli in the UK despite national prescribing restriction*. Lancet, 2001. **357**(9265): p. 1325-8.
320. Bean, D.C., et al., *Resistance among Escherichia coli to sulphonamides and other antimicrobials now little used in man*. J Antimicrob Chemother, 2005. **56**(5): p. 962-4.

321. Johnsen, P.J., et al., *Factors affecting the reversal of antimicrobial-drug resistance*. Lancet Infect Dis, 2009. **9**(6): p. 357-64.
322. Chapman, J.S., *Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance*. International Biodeterioration and biodegradation, 2003. **51**: p. 271-276.
323. Foster, T.J., *Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria*. Microbiol Rev, 1983. **47**(3): p. 361-409.
324. Novick, R.P. and C. Roth, *Plasmid-linked resistance to inorganic salts in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 1968. **95**(4): p. 1335-42.
325. Aarestrup, F.M., et al., *Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(8): p. 4127-9.
326. Hasman, H. and F.M. Aarestrup, *tcrB, a gene conferring transferable copper resistance in Enterococcus faecium: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(5): p. 1410-6.
327. Bass, L., et al., *Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(12): p. 2925-9.
328. Liebert, C.A., R.M. Hall, and A.O. Summers, *Transposon Tn21, flagship of the floating genome*. Microbiol Mol Biol Rev, 1999. **63**(3): p. 507-22.
329. Wireman, J., et al., *Association of mercury resistance with antibiotic resistance in the gram-negative fecal bacteria of primates*. Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(11): p. 4494-503.
330. Mindlin, S., et al., *Mercury resistance transposons of gram-negative environmental bacteria and their classification*. Res Microbiol, 2001. **152**(9): p. 811-22.
331. Sorensen, S.J., et al., *Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(9): p. 700-10.
332. Thomas, C.M., *Evolution and population genetics of bacterial plasmids*, in *Plasmid Biology*, B.E. Funnal and G.J. Philips, Editors. 2004, ASM Press: Washington, D.C. p. 509-528.

333. Weaver, K.E., L.B. Rice, and G. Churchward, *Plasmids and Transposons*, in *The Enterococci: Pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*, M.S. Gilmore, Editor. 2002, ASM Press: Washington, D.C. p. 219-263.
334. Carattoli, A., *Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(6): p. 2227-38.
335. Novick, R.P., *Plasmid incompatibility*. Microbiol Rev, 1987. **51**(4): p. 381-95.
336. Chang, S., et al., *Infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus containing the vanA resistance gene*. N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1342-7.
337. Flannagan, S.E., et al., *Plasmid content of a vancomycin-resistant Enterococcus faecalis isolate from a patient also colonized by Staphylococcus aureus with a VanA phenotype*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(12): p. 3954-9.
338. Clewell, D.B. and M.V. Francia, *Conjugation in Gram-positive bacteria*, in *Plasmid Biology*, B.E. Funnal and G.J. Philips, Editors. 2004, ASM Press: Washington D.C. p. 227-256.
339. Weaver, K.E., et al., *The RepA_N replicons of Gram-positive bacteria: a family of broadly distributed but narrow host range plasmids*. Plasmid, 2009. **61**(2): p. 94-109.
340. Grady, R. and F. Hayes, *Axe-Txe, a broad-spectrum proteic toxin-antitoxin system specified by a multidrug-resistant, clinical isolate of Enterococcus faecium*. Mol Microbiol, 2003. **47**(5): p. 1419-32.
341. Jensen, L.B., et al., *A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria*. J Microbiol Methods, 2010. **80**(1): p. 25-43.
342. Rosvoll, T.C., et al., *PCR-based plasmid typing in Enterococcus faecium strains reveals widely distributed pRE25-, pRUM-, pIP501- and pHTbeta-related replicons associated with glycopeptide resistance and stabilizing toxin-antitoxin systems*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010. **58**(2): p. 254-68.
343. Arias, C.A., et al., *Cotransfer of antibiotic resistance genes and a hylefms-containing virulence plasmid in Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(10): p. 4240-6.
344. Barton, B.M., G.P. Harding, and A.J. Zuccarelli, *A general method for detecting and sizing large plasmids*. Anal Biochem, 1995. **226**(2): p. 235-40.

345. Sletvold, H., et al., *Comparative DNA analysis of two vanA plasmids from Enterococcus faecium strains isolated from poultry and a poultry farmer in Norway*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(2): p. 736-9.
346. Tanimoto, K. and Y. Ike, *Complete nucleotide sequencing and analysis of the 65-kb highly conjugative Enterococcus faecium plasmid pMG1: identification of the transfer-related region and the minimum region required for replication*. FEMS Microbiol Lett, 2008. **288**(2): p. 186-95.
347. Zhu, W., et al., *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolates associated with Inc18-like vanA plasmids in Michigan*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(2): p. 452-7.
348. Laverde Gomez, J.A., et al., *A multiresistance megaplasmid pLGI bearing a hyl(Efm) genomic island in hospital Enterococcus faecium isolates*. Int J Med Microbiol, 2010.
349. Laverde Gomez, J.A., et al., *A multiresistance megaplasmid pLGI bearing a hylEfm genomic island in hospital Enterococcus faecium isolates*. Int J Med Microbiol, 2010. **301**(2): p. 165-75.
350. Zielenkiewicz, U. and P. Ceglowski, *Mechanisms of plasmid stable maintenance with special focus on plasmid addiction systems*. Acta Biochim Pol, 2001. **48**(4): p. 1003-23.
351. Francia, M.V., et al., *Replication of Enterococcus faecalis pheromone-responding plasmid pAD1: location of the minimal replicon and oriV site and RepA involvement in initiation of replication*. J Bacteriol, 2004. **186**(15): p. 5003-16.
352. Francia, M.V., et al., *Characterization of an active partition system for the Enterococcus faecalis pheromone-responding plasmid pAD1*. J Bacteriol, 2007. **189**(23): p. 8546-55.
353. Funnell, B.E. and R.A. Slavcev, *Partition systems of bacterial plasmids.*, in *Plasmid Biology*, B.E. Funnell and G. Phillips, Editors. 2004, ASM Press: Washington, D.C. p. 81-103.

354. Weaver, K.E., et al., *Antisense RNA regulation by stable complex formation in the Enterococcus faecalis plasmid pAD1 par addiction system*. J Bacteriol, 2004. **186**(19): p. 6400-8.
355. Weaver, K.E., et al., *Enterococcus faecalis plasmid pAD1-encoded Fst toxin affects membrane permeability and alters cellular responses to lantibiotics*. J Bacteriol, 2003. **185**(7): p. 2169-77.
356. Flannagan, S.E., D.B. Clewell, and C.M. Sedgley, *A "retrocidal" plasmid in Enterococcus faecalis: passage and protection*. Plasmid, 2008. **59**(3): p. 217-30.
357. Ploy, M.C., et al., *Integrans: an antibiotic resistance gene capture and expression system*. Clin Chem Lab Med, 2000. **38**(6): p. 483-7.
358. Kovalevskaya, N., *Mobile Gene Cassettes and Integrans*. Molecular Biology, 2002. **36**(2): p. 196-201.
359. Rowe-Magnus, D.A., A.M. Guerout, and D. Mazel, *Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes*. Mol Microbiol, 2002. **43**(6): p. 1657-69.
360. Ploy, M.C., et al., *[The role of integrans in dissemination of antibiotic resistance]*. Ann Biol Clin (Paris), 2000. **58**(4): p. 439-44.
361. Clark, N.C., et al., *Detection of a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase gene (aadA) in Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(1): p. 157-60.
362. Xu, Z., et al., *First report of class 2 integron in clinical Enterococcus faecalis and class 1 integron in Enterococcus faecium in South China*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010. **68**(3): p. 315-7.
363. Manson, J.M., L.E. Hancock, and M.S. Gilmore, *Mechanism of chromosomal transfer of Enterococcus faecalis pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(27): p. 12269-74.
364. Laverde Gomez, J.A., et al., *Intra- and Interspecies Genomic Transfer of the Enterococcus faecalis Pathogenicity Island*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e16720.
365. Hacker, J. and J.B. Kaper, *Pathogenicity islands and the evolution of microbes*. Annual Review of Microbiology, 2000. **54**: p. 641-679.

366. Martinez, J.L. and F. Baquero, *Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(4): p. 647-79.
367. Luck, S.N., et al., *Ferric dicitrate transport system (Fec) of Shigella flexneri 2a YSH6000 is encoded on a novel pathogenicity island carrying multiple antibiotic resistance genes*. Infect Immun, 2001. **69**(10): p. 6012-21.
368. Turner, S.A., et al., *Molecular epidemiology of the SRL pathogenicity island*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(2): p. 727-34.
369. Nallapareddy, S.R., et al., *Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-receptive Enterococcus faecalis lineage and dissemination of its putative pathogenicity island*. J Bacteriol, 2005. **187**(16): p. 5709-18.
370. Semedo-Lemsaddek, T., M.T. Barreto-Crespo, and R. Tenreiro, *Occurrence of putative pathogenicity islands in enterococci from distinct species and of differing origins*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(22): p. 7271-4.
371. Eliopoulos, G.M., *Antimicrobial resistance in the Enterococcus*, in *Bacterial Resistance to Antimicrobials*, L.K. Wax R.G., Salyers A.A., Taber H, Editor. 2008, CRC Press. p. 255
372. Rasheed, J. and F.C. Tenover, *Detection and Characterization of Antimicrobial Resistance Genes in Bacteria*, in *Manual of Clinical Microbiology*, E.J. Murray, et al., Editors. 2003, ASM Press: Washington D.C. p. 1196-1213.
373. Simjee, S., et al., *Enterococcus*, in *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*, F.M. Aarestrup, Editor. 2006, ASM Press: Washington. p. 315-328.
374. Tannock, G.W. and G.M. Cook, *Enterococci as Members of the Intestinal Microflora of Humans*, in *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*, M.S. Gilmore, Editor. 2002, ASM Press: Washington, D.C. p. 101-132.
375. Singh, K.V., G.M. Weinstock, and B.E. Murray, *An Enterococcus faecalis ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(6): p. 1845-50.

376. Kak, V. and J.W. Chow, *Acquired Antibiotic Resistances in Enterococci*, in *The enterococci : pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*, M.S. Gilmore, Editor. 2002, ASM Press: Washington DC. p. 355-384.
377. Donskey, C.J., et al., *Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients*. N Engl J Med, 2000. **343**(26): p. 1925-32.
378. Ubeda, C., et al., *Vancomycin-resistant Enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans*. J Clin Invest, 2010. **120**(12): p. 4332-41.
379. Brandl, K., et al., *Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits*. Nature, 2008. **455**(7214): p. 804-7.
380. Kinnebrew, M.A., et al., *Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant Enterococcus infection*. J Infect Dis, 2010. **201**(4): p. 534-43.
381. Arias, C.A. and B.E. Murray, *The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(4): p. 266-78.
382. (FDA) U.S. Food and Drug Administration. Center for Veterinary Medicine. Human-use antibiotics in livestock production [Online.] 2000 [cited 2011, July 13th]; Available from: www.fda.gov/cvm/HRESP106_157.htm.
383. Anonymous, *Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA)*. 2008, Agence de la santé publique du Canada: Guelph. p. 66.
384. Lévesque, J., C. Klopfenstein, and J. Rivest, *Effet des antimicrobiens à titre de facteur de croissance chez le porc de statut conventionnel et période de croissance-finition*. 2011, Centre de développement du porc du Québec. p. 44.
385. Aarestrup, F.M., et al., *Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2000. **37**(2): p. 127-37.
386. Butaye, P., L.A. Devriese, and F. Haesebrouck, *Differences in antibiotic resistance patterns of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium strains*

- isolated from farm and pet animals*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(5): p. 1374-8.
387. Delsol, A.A., et al., *Effect of the growth promoter avilamycin on emergence and persistence of antimicrobial resistance in enteric bacteria in the pig*. J Appl Microbiol, 2005. **98**(3): p. 564-71.
 388. Fard, R.M., M.W. Heuzenroeder, and M.D. Barton, *Antimicrobial and heavy metal resistance in commensal enterococci isolated from pigs*. Vet Microbiol, 2011. **148**(2-4): p. 276-82.
 389. Getachew, Y.M., et al., *Characterization of vancomycin-resistant Enterococcus isolates from broilers in Selangor, Malaysia*. Trop Biomed, 2009. **26**(3): p. 280-8.
 390. Hayes, J.R., et al., *Distribution of streptogramin resistance determinants among Enterococcus faecium from a poultry production environment of the USA*. J Antimicrob Chemother, 2005. **55**(1): p. 123-6.
 391. Hershberger, E., et al., *Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin*. J Antimicrob Chemother, 2005. **55**(1): p. 127-30.
 392. Manson, J.M., et al., *Acquired bacitracin resistance in Enterococcus faecalis is mediated by an ABC transporter and a novel regulatory protein, BcrR*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(10): p. 3743-8.
 393. Matos, R., et al., *Study on the dissemination of the bcrABDR cluster in Enterococcus spp. reveals that the BcrAB transporter is sufficient to confer high-level bacitracin resistance*. Int J Antimicrob Agents, 2009. **34**(2): p. 142-7.
 394. Torres, C., et al., *Intestinal colonization by vanA- or vanB2-containing enterococcal isolates of healthy animals in Spain*. Microb Drug Resist, 2003. **9 Suppl 1**: p. S47-52.
 395. Zou, L.K., et al., *Erythromycin resistance and virulence genes in Enterococcus faecalis from swine in China*. New Microbiol, 2011. **34**(1): p. 73-80.
 396. Jung, Y.H., et al., *Characterization of two new genes, vgaD and vatG, conferring resistance to streptogramin A in Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother, 2010.

397. Petsaris, O., et al., *Combined antimicrobial resistance in Enterococcus faecium isolated from chickens*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(5): p. 2796-9.
398. Soltani, M., et al., *Mechanisms of resistance to quinupristin-dalfopristin among isolates of Enterococcus faecium from animals, raw meat, and hospital patients in Western Europe*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(2): p. 433-6.
399. Aarestrup, F.M., et al., *Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of resistance among Enterococcus faecium from broilers and pigs in Denmark, Finland, and Norway*. Microb Drug Resist, 2000. **6**(1): p. 63-70.
400. Anonymous, *Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA) - Résultats préliminaires*. 2009, Agence de la santé publique du Canada: Guelph. p. 61.
401. Aslam, M., M.S. Diarra, and L. Masson, *Characterization of Antimicrobial Resistance and Virulence Genotypes of Enterococcus faecalis Recovered from a Pork Processing Plant*. J Food Prot, 2012. **75**(8): p. 1486-91.
402. Herrero, I.A., et al., *Dogs should be included in surveillance programs for vancomycin-resistant enterococci*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(3): p. 1384-5.
403. Manian, F.A., *Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts*. Clin Infect Dis, 2003. **36**(2): p. e26-8.
404. Simjee, S., et al., *Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolated from canine urinary tract infections: evidence of gene exchange between human and animal enterococci*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(12): p. 4659-65.
405. Ghosh, A., S.E. Dowd, and L. Zurek, *Dogs leaving the ICU carry a very large multi-drug resistant enterococcal population with capacity for biofilm formation and horizontal gene transfer*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22451.
406. Caryl, J.A., et al., *"tet(U)" is not a tetracycline resistance determinant*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(6): p. 3378-9.

407. Jackson, C.R., et al., *Mechanisms of antimicrobial resistance and genetic relatedness among enterococci isolated from dogs and cats in the United States*. J Appl Microbiol, 2010. **108**(6): p. 2171-9.
408. Leener, E.D., et al., *Presence and mechanism of antimicrobial resistance among enterococci from cats and dogs*. Microb Drug Resist, 2005. **11**(4): p. 395-403.
409. Hayes, J.R., et al., *Multiple-antibiotic resistance of Enterococcus spp. isolated from commercial poultry production environments*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(10): p. 6005-11.
410. Jett, B.D., M.M. Huycke, and M.S. Gilmore, *Virulence of enterococci*. Clin Microbiol Rev, 1994. **7**(4): p. 462-78.
411. Lim, S.K., et al., *Pheromone-responsive conjugative vancomycin resistance plasmids in Enterococcus faecalis isolates from humans and chicken feces*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(10): p. 6544-53.
412. Horvath, P. and R. Barrangou, *CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea*. Science, 2010. **327**(5962): p. 167-70.
413. Marraffini, L.A. and E.J. Sontheimer, *CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(3): p. 181-90.
414. Barrangou, R., et al., *CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes*. Science, 2007. **315**(5819): p. 1709-12.
415. Deveau, H., et al., *Phage response to CRISPR-encoded resistance in Streptococcus thermophilus*. J Bacteriol, 2008. **190**(4): p. 1390-400.
416. Brouns, S.J., et al., *Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes*. Science, 2008. **321**(5891): p. 960-4.
417. Marraffini, L.A. and E.J. Sontheimer, *CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA*. Science, 2008. **322**(5909): p. 1843-5.
418. Grissa, I., G. Vergnaud, and C. Pourcel, *The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats*. BMC Bioinformatics, 2007. **8**: p. 172.

419. Horvath, P., et al., *Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes*. Int J Food Microbiol, 2009. **131**(1): p. 62-70.
420. Palmer, K.L. and M.S. Gilmore, *Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas*. MBio, 2010. **1**(4).
421. Courvalin, P., *Genetics of glycopeptide resistance in gram-positive pathogens*. Int J Med Microbiol, 2005. **294**(8): p. 479-86.
422. Courvalin, P., *Vancomycin resistance in gram-positive cocci*. Clin Infect Dis, 2006. **42 Suppl 1**: p. S25-34.
423. Handwerger, S., M.J. Pucci, and A. Kolokathis, *Vancomycin resistance is encoded on a pheromone response plasmid in Enterococcus faecium 228*. Antimicrob Agents Chemother, 1990. **34**(2): p. 358-60.
424. Heaton, M.P., et al., *Mobilization of vancomycin resistance by transposon-mediated fusion of a VanA plasmid with an Enterococcus faecium sex pheromone-response plasmid*. Gene, 1996. **171**(1): p. 9-17.
425. Magi, G., et al., *Presence of a vanA-carrying pheromone response plasmid (pBRG1) in a clinical isolate of Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(5): p. 1571-6.
426. Showsh, S.A., E.H. De Boever, and D.B. Clewell, *Vancomycin resistance plasmid in Enterococcus faecalis that encodes sensitivity to a sex pheromone also produced by Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(7): p. 2177-8.
427. Christie, P.J. and G.M. Dunny, *Identification of regions of the Streptococcus faecalis plasmid pCF-10 that encode antibiotic resistance and pheromone response functions*. Plasmid, 1986. **15**(3): p. 230-41.
428. Murray, B.E., F.Y. An, and D.B. Clewell, *Plasmids and pheromone response of the beta-lactamase producer Streptococcus (Enterococcus) faecalis HH22*. Antimicrob Agents Chemother, 1988. **32**(4): p. 547-51.
429. Vickerman, M.M., et al., *A genetic determinant in Streptococcus gordonii Challis encodes a peptide with activity similar to that of enterococcal sex pheromone cAM373, which facilitates intergeneric DNA transfer*. J Bacteriol, 2010. **192**(10): p. 2535-45.

430. Firth, N., et al., *A lipoprotein signal peptide encoded by the staphylococcal conjugative plasmid pSK41 exhibits an activity resembling that of Enterococcus faecalis pheromone cAD1*. J Bacteriol, 1994. **176**(18): p. 5871-3.
431. Anonymous. *Marché de la volaille : Coup d'oeil sur l'industrie avicole canadienne*. 2011 [cited 2011, August 18th]; Available from: http://www.agr.gc.ca/poultry/glpl_fra.htm.
432. Zhang, J., et al., *Contamination Rates and Antimicrobial Resistance in Enterococcus spp., Escherichia coli, and Salmonella Isolated from "No Antibiotics Added"-Labeled Chicken Products*. Foodborne Pathog Dis, 2011.
433. Anonymous. *Canada Porc International*. 2011 [cited 2011, August 18th]; Available from: <http://www.canadapork.com/fr>.
434. Graham, J.P., et al., *Fate of antimicrobial-resistant enterococci and staphylococci and resistance determinants in stored poultry litter*. Environ Res, 2009. **109**(6): p. 682-9.
435. Hayes, J.R., et al., *Prevalence and antimicrobial resistance of enterococcus species isolated from retail meats*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(12): p. 7153-60.
436. Jackson, C.R., et al., *Genetic relatedness of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry carcasses*. Avian Dis, 2004. **48**(1): p. 100-7.
437. Aarestrup, F.M., P. Butaye, and W. Witte, *Nonhuman Reservoirs of Enterococci*, in *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*, M.S. Gilmore, Editor. 2002, ASM Press: Washington, D.C. p. 55-99.
438. Tremblay, C.L., et al., *Multiple-Antibiotic Resistance of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium from Cecal Contents in Broiler Chicken and Turkey Flocks Slaughtered in Canada and Plasmid Colocalization of tetO and ermB Genes*. J Food Prot, 2011. **74**(10): p. 1639-48.
439. Tremblay, C.L., et al., *Antibiotic-resistant Enterococcus faecalis in abattoir pigs and plasmid colocalization and cotransfer of tet(M) and erm(B) genes*. J Food Prot, 2012. **75**(9): p. 1595-602.
440. Allard, M. *Croissance des porcs : les antibiotiques n'ont pas d'effets significatifs*. 2011 [cited 2011 22 septembre]; Available from:

<http://www.cyberpresse.ca/vivre/sante/nutrition/201108/30/01-4429983-croissance-des-porcs-les-antibiotiques-nont-pas-deffets-significatifs.php>.

441. Sharfstein, J.M., *Testimony*. 14 July 2010, FDA, Silver Spring, MD.
442. FDA, *The judicious use of medically important antimicrobial drugs in food-producing animals. Draft guidance 209*. 2010, Center for Veterinary Medicine, FDA, Washington, DC.
443. Boerlin, P. and R.J. Reid-Smith, *Antimicrobial resistance: its emergence and transmission*. Anim Health Res Rev, 2008. **9**(2): p. 115-26.
444. Versalovic, J., T. Koeuth, and J.R. Lupski, *Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes*. Nucleic Acids Research, 1991. **19**(24): p. 6823-31.
445. Simjee, S., et al., *Identification of vat(E) in Enterococcus faecalis isolates from retail poultry and its transferability to Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(12): p. 3823-8.
446. Davies, J. and G.D. Wright, *Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics*. Trends Microbiol, 1997. **5**(6): p. 234-40.
447. Leclercq, R., et al., *Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides*. Clin Infect Dis, 1992. **15**(3): p. 495-501.
448. Zilhao, R., B. Papadopoulou, and P. Courvalin, *Occurrence of the Campylobacter resistance gene tetO in Enterococcus and Streptococcus spp*. Antimicrob Agents Chemother, 1988. **32**(12): p. 1793-6.
449. Brenciani, A., et al., *Genetic elements carrying erm(B) in Streptococcus pyogenes and association with tet(M) tetracycline resistance gene*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(4): p. 1209-16.
450. Smillie, C., et al., *Mobility of plasmids*. Microbiol Mol Biol Rev, 2010. **74**(3): p. 434-52.
451. Clewell, D.B., et al., *Enterococcal plasmid transfer: sex pheromones, transfer origins, relaxases, and the Staphylococcus aureus issue*. Plasmid, 2002. **48**(3): p. 193-201.

452. De Boever, E.H., D.B. Clewell, and C.M. Fraser, *Enterococcus faecalis conjugative plasmid pAM373: complete nucleotide sequence and genetic analyses of sex pheromone response*. Mol Microbiol, 2000. **37**(6): p. 1327-41.
453. Werckenthin, C., S. Schwarz, and K. Dyke, *Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance in Staphylococcus lentus results from the integration of part of a transposon into a small plasmid*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(9): p. 2224-5.
454. Tomich, P.K., F.Y. An, and D.B. Clewell, *Properties of erythromycin-inducible transposon Tn917 in Streptococcus faecalis*. J Bacteriol, 1980. **141**(3): p. 1366-74.
455. Franke, A.E. and D.B. Clewell, *Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in Streptococcus faecalis that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid*. J Bacteriol, 1981. **145**(1): p. 494-502.
456. Cao, M. and J.D. Helmann, *Regulation of the Bacillus subtilis bcrC bacitracin resistance gene by two extracytoplasmic function sigma factors*. J Bacteriol, 2002. **184**(22): p. 6123-9.
457. Mascher, T., et al., *Cell wall stress responses in Bacillus subtilis: the regulatory network of the bacitracin stimulon*. Mol Microbiol, 2003. **50**(5): p. 1591-604.
458. Zhang, L., et al., *Acquired antibiotic resistance: are we born with it?* Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(20): p. 7134-41.
459. Looft, T., et al., *In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(5): p. 1691-6.
460. Marshall, B.M. and S.B. Levy, *Food animals and antimicrobials: impacts on human health*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(4): p. 718-33.
461. Kuczynski, J., et al., *Experimental and analytical tools for studying the human microbiome*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(1): p. 47-58.
462. Lamendella, R., et al., *Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut*. BMC Microbiol, 2011. **11**: p. 103.

463. Christie, P.J., et al., *Two conjugation systems associated with Streptococcus faecalis plasmid pCF10: identification of a conjugative transposon that transfers between S. faecalis and Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1987. **169**(6): p. 2529-36.
464. Pontius, L.T. and D.B. Clewell, *A phase variation event that activates conjugation functions encoded by the Enterococcus faecalis plasmid pAD1*. Plasmid, 1991. **26**(3): p. 172-85.
465. Heath, D.G., et al., *Phase variation of Enterococcus faecalis pAD1 conjugation functions relates to changes in iteron sequence region*. J Bacteriol, 1995. **177**(19): p. 5453-9.
466. Galli, D., A. Friesenegger, and R. Wirth, *Transcriptional control of sex-pheromone-inducible genes on plasmid pAD1 of Enterococcus faecalis and sequence analysis of a third structural gene for (pPD1-encoded) aggregation substance*. Mol Microbiol, 1992. **6**(10): p. 1297-308.
467. Weaver, K.E. and D.B. Clewell, *Control of Enterococcus faecalis sex pheromone cAD1 elaboration: effects of culture aeration and pAD1 plasmid-encoded determinants*. Plasmid, 1991. **25**(3): p. 177-89.
468. Licht, T.R., et al., *Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role of community structure and environment*. Microbiology, 1999. **145** (Pt 9): p. 2615-22.
469. Willems, R.J., et al., *Host specificity of vancomycin-resistant Enterococcus faecium*. J Infect Dis, 2000. **182**(3): p. 816-23.
470. Damborg, P., A.H. Sorensen, and L. Guardabassi, *Monitoring of antimicrobial resistance in healthy dogs: first report of canine ampicillin-resistant Enterococcus faecium clonal complex 17*. Vet Microbiol, 2008. **132**(1-2): p. 190-6.
471. Damborg, P., et al., *Dogs are a reservoir of ampicillin-resistant Enterococcus faecium lineages associated with human infections*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(8): p. 2360-5.
472. Kwon, K.H., et al., *Detection of CC17 Enterococcus faecium in Dogs and a Comparison with Human Isolates*. Zoonoses Public Health, 2012. **59**(6): p. 375-8.

- 473. Jureen, R., et al., *Molecular characterization of ampicillin-resistant Enterococcus faecium isolates from hospitalized patients in Norway*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(6): p. 2330-6.
- 474. Brisse, S., et al., *Association of alterations in ParC and GyrA proteins with resistance of clinical isolates of Enterococcus faecium to nine different fluoroquinolones*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(10): p. 2513-6.
- 475. Leavis, H.L., et al., *High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in gyrA and parC confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(3): p. 1059-64.
- 476. Valdezate, S., et al., *Clonal outbreak of ST17 multidrug-resistant Enterococcus faecium harbouring an Inc18-like::Tn1546 plasmid in a haemo-oncology ward of a Spanish hospital*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(4): p. 832-6.
- 477. Werner, G., et al., *High-level ciprofloxacin resistance among hospital-adapted Enterococcus faecium (CC17)*. Int J Antimicrob Agents, 2010. **35**(2): p. 119-25.
- 478. Jonas, B.M., B.E. Murray, and G.M. Weinstock, *Characterization of emeA, a NorA homolog and multidrug resistance efflux pump, in Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(12): p. 3574-9.
- 479. Lee, E.W., et al., *EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(12): p. 3733-8.
- 480. Nishioka, T., et al., *Gene cloning and characterization of EfmA, a multidrug efflux pump, from Enterococcus faecium*. Biol Pharm Bull, 2009. **32**(3): p. 483-8.
- 481. Low, Y.L., et al., *Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of Enterococcus faecalis*. J Med Microbiol, 2003. **52**(Pt 2): p. 113-9.
- 482. Marothi, Y.A., H. Agnihotri, and D. Dubey, *Enterococcal resistance--an overview*. Indian J Med Microbiol, 2005. **23**(4): p. 214-9.
- 483. Ossiprandi, M.C., et al., *Susceptibility to vancomycin and other antibiotics of 165 Enterococcus strains isolated from dogs in Italy*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2008. **31**(1): p. 1-9.

484. Garcia-Migura, L., H. Hasman, and L.B. Jensen, *Presence of pRII: a small cryptic mobilizable plasmid isolated from Enterococcus faecium of human and animal origin*. Curr Microbiol, 2009. **58**(2): p. 95-100.
485. Derbise, A., G. de Cespedes, and N. el Solh, *Nucleotide sequence of the Staphylococcus aureus transposon, Tn5405, carrying aminoglycosides resistance genes*. J Basic Microbiol, 1997. **37**(5): p. 379-84.
486. Aarestrup, F.M. and H. Hasman, *Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection*. Vet Microbiol, 2004. **100**(1-2): p. 83-9.
487. Mazaheri Nezhad Fard, R., M.W. Heuzenroeder, and M.D. Barton, *Antimicrobial and heavy metal resistance in commensal enterococci isolated from pigs*. Vet Microbiol, 2010.
488. Nandi, S., et al., *Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(18): p. 7118-22.
489. Lindenstrauss, A.G., et al., *Comparison of genotypic and phenotypic cluster analyses of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium*. Syst Appl Microbiol, 2011.

